

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO

im. Jerzego Kukuczki w Katowicach

Rozprawa na tytuł doktora nauk o kulturze fizycznej

**Zmiany pola powierzchni odleżyn oraz ekspresja genów wybranych metaloproteinaz
i transformującego czynnika wzrostu w odleżynach u ludzi po zastosowaniu
elektrostymulacji wysokonapięciowej**

Bogna Szottys-Brzezowska

Promotor: dr hab. Anna Polak prof. AWF Katowice

Katedra Fizjoterapii w Chorobach Wewnętrznych, Wydział Fizjoterapii
Akademia Wychowania Fizycznego im. Jerzego Kukuczki w Katowicach

Katowice 2024

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	4
1. WPROWADZENIE	6
1.1. Proces gojenia się ran	6
1.2. Rany przewlekłe; Odleżyny.....	15
1.3. Elektrostymulacja w leczeniu ran przewlekłych.....	18
1.4. Nowatorstwo badania	24
2. CELE BADANIA	25
3. METODY.....	27
3.1. Projekt badania	27
3.2. Zgoda Komisji Bioetycznej i rejestracja badania	27
3.3. Kryteria włączenia i wyłączenia z badania.....	28
3.4. Informacja dla pacjenta	28
3.5. Przydział do grup (randomizacja).....	28
3.6. Zaślepienie	29
3.7. Metody diagnostyczne.....	29
3.7.1. Metoda klasyfikacji odleżyn	29
3.7.2. Ocena klinicznych postępów gojenia się odleżyn.	30
3.7.3. Ocena ekspresji mRNA dla MMP i TGF-β.....	30
3.8. Metody leczenia	33
3.9. Główny efekt końcowy badania	36
3.10. Drugorzędne efekty końcowe badania.	37
3.11. Wskaźniki zastosowane do oceny zmian pola powierzchni odleżyn.....	38
3.12. Analiza statystyczna.....	38
4. WYNIKI.....	40
4.1. Charakterystyka badanych i ocena jednorodności grup przed badaniem.....	40
4.2. Główne efekty końcowe	45
4.2.1. Zmiany pola powierzchni odleżyn w poszczególnych tygodniach leczenia	45
4.3. Drugorzędne efekty końcowe badania	51
4.3.1. Relatywna ekspresja mRNA MMP-1,2,9	51
4.3.2. Relatywna ekspresja mRNA TGF-β1, 2, 3.....	54
4.4. Ocena korelacji pomiędzy RE mRNA MMP i TGF-β, a zmianami pola powierzchni odleżyn.....	58

5. DYSKUSJA	60
5.1. Omówienie wyników	60
5.2. Odniesienie wyników własnych do badań innych autorów	61
5.2.1. Główne efekty końcowe badania.....	61
5.2.2. Drugorzędne efekty końcowe badania	65
5.3. Zalecenia do stosowania elektrostymulacji wysokonapięciowej w leczeniu odleżyn u ludzi.....	69
5.4. Moce strony oraz ograniczenia w badaniu własnym	70
6. WNIOSKI	73
7. Piśmiennictwo.....	75
8. Wykaz tabel	99
9. Wykaz rycin.....	100
10. Streszczenie w j. polskim	101
11. Streszczenie w j. angielskim	104

WYKAZ SKRÓTÓW

α -SMA	–	α -aktyna mięśni gładkich (ang. α -smooth muscle actin)
ACTB	–	Beta -aktyna (β -aktyna; ang. beta-actin)
BMC EPC	–	komórki progenitorowe śródbłónka pochodzące ze szpiku kostnego (ang. bone marrow-derived endothelial progenitor cell)
BMI	–	indeks masy ciała (ang. body mass index)
CTGF	–	czynnik wzrostu tkanki łącznej (ang. connective tissue growth factor)
ECM	–	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix)
EGF	–	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor)
ES	–	elektrostymulacja
EWN	–	elektrostymulacja wysokonapięciowa
FGF-2	–	czynnik wzrostu fibroblastów-2 (ang. fibroblast growth factor-2)
GAG	–	glikozaminoglikany
GEA	–	grupa eksperymentalna, w której zastosowano elektrostymulację anodową
GEK	–	grupa eksperymentalna, w której zastosowano elektrostymulację katodową
GRO- α	–	onkogen związany ze wzrostem- α (ang. growth-related oncogene- α)
GK	–	grupa kontrolna
HA	–	kwas hialuronowy (ang. hyaluronic acid)
HbA1C	–	hemoglobina glikowana (ang. glycated haemoglobin)
HB-EGF	–	czynnik wzrostu wiążący heparynę podobny do EGF (ang. heparin-binding EGF-like growth factor)
IFN	–	interferon
IGF-1	–	insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (ang. insulin-like growth factor)
IL	–	interleukina (ang. interleukine)
KGF	–	czynnik wzrostu keratynocytów (ang. keratinocyte growth factor)
LK	–	liczba kopii
MCP-1	–	monocytny chemotaktyczny czynnik białkowy-1 (ang. monocyte chemoattractant protein-1)

MMIF	–	czynnik hamujący migrację makrofagów (ang. macrophage migration inhibitory factor)
MMP	–	metaloproteinaza/metaloproteinazy macierzy (ang. matrix metalloproteinase)
NO	–	tlenek azotu (ang. nitric oxide)
NOS	–	syntazę tlenku azotu (ang. nitric oxide synthases)
ORP 150	–	białko związane z tlenem 150 (ang. oxygen regulated protein 150)
PDGF	–	płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor)
RE	–	relatywna ekspresja
sICAM-1	–	rozpuszczalna międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1 (ang. soluble intercellular adhesion molecule-1)
sVCAM-1	–	rozpuszczalna naczyniowa cząsteczka adhezyjna-1 (ang. circulating vascular cell adhesion molecule-1)
TcPO2	–	ciśnienie parcjalne tlenu
TIMP	–	tkankowy inhibitor metaloproteinaz (ang. tissue inhibitor metalloproteinases)
TGF- β	–	transformujący czynnik wzrostu- β (ang. transforming growth factor- β)
TNF- α	–	czynnik martwicy nowotworu- α (ang. tumor necrosis factor- α)
TRPV-4	–	receptory waniloidowe-4 kanałów wapniowych aktywowanych przejściowym potencjałem elektrycznym (ang. transient receptor potential vanilloid-4 channels)
uPA	–	urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA, ang. urokinase-type plasminogen activator)
VEGF	–	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)

1. WPROWADZENIE

1.1. Proces gojenia się ran

Gojenie się ran powstałych w wyniku uszkodzenia skóry jest procesem złożonym, którego celem jest naprawa uszkodzonej tkanki oraz przywrócenie funkcji skóry. Natychmiast po zranieniu, w miejscu uszkodzenia rozpoczyna się tworzenie skrzepu fibrynowego, którego celem jest zatrzymanie krwawienia (hemostaza), po czym występują kolejne, zachodzące na siebie fazy gojenia się rany, mianowicie: faza zapalenia, odbudowy oraz dojrzewania i przebudowy.¹

W tworzenie się skrzepu zaangażowane są płytki krwi. W fazie zapalenia uczestniczą komórki zapalne, takie jak: neutrofile, limfocyty, komórki tuczne i makrofagi, a w proces odbudowy zaangażowane są fibroblasty, miofibroblasty, fibrocyty i keratynocyty. Aktywność komórek uczestniczących w procesie gojenia się ran jest regulowana przez mediatory procesu gojenia się ran (nazywane również cząsteczkami sygnałowymi), do których należą rozpuszczalne proteiny, w tym: chemokiny, cytokiny, enzymy, hormony i czynniki wzrostu. Mediatorzy te na drodze mechanizmów autokrynych, parakrynych i endokrynych modulują migrację, proliferację i różnicowanie się komórek zaangażowanych w gojenie się ran. Mediatorzy łącząc się ze specyficznymi dla siebie receptorami na powierzchni komórek stymulują odpowiednie reakcje komórkowe.¹⁻³

Powstanie czopu fibrynowego i hemostaza

Pierwszym etapem procesu gojenia się ran jest zatrzymanie krwawienia z uszkodzonych naczyń krwionośnych poprzez utworzenie skrzepu fibrynowego. Skrzep najpierw zatrzymuje krwawienie (zatykając uszkodzone naczynia krwionośne poprzez agregację płytek krwi), a następnie służy jako tymczasowa matryca do gojenia się ran.⁴

Aktywacja płytek krwi: Płytki krwi w warunkach prawidłowych krążą w naczyniach krwionośnych, ale nie przylegają do śródbłonna naczyń krwionośnych. Po uszkodzeniu śródbłonna naczyń i w wyniku ekspozycji na składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. extracellular matrix) płytki krwi szybko zaczynają przylegać do śródbłonna, rekrutują kolejne płytki krwi i inicjują kaskadę krzepnięcia.⁴ Mechanizmy te zachodzą wskutek uwalniania z płytek krwi serotoniny, difosforanu adenozyliny, tromboksanu-A₂, fibrynogenu, fibronektyny, czynnika von Willebranda oraz trombospondyny.⁵ Aktywne płytki krwi wydzielają także czynniki wzrostu, których zadaniem jest między innymi stymulacja

fibroblastów znajdujących się w obszarze rany i zapoczątkowanie proliferacji ran. Aktywne fibroblasty produkują kolagen, proteoglikany i glikozaminoglikany, które tworzą tymczasową macierz skrzepu fibrynowego. Wśród czynników wzrostu wydzielanych przez płytki krwi znajdują się płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, ang. platelet-derived growth factor), transformujący czynnik wzrostu- α i - β (TGF- α i TGF- β , ang. transforming growth factor) oraz naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, ang. epidermal growth factor).^{6,7}

Czop fibrynowy: Płytki krwi wydzielają fibrynogen, który początkowo układa się w niestabilną strukturę. Następnie pod wpływem trombiny (znajdującej się na powierzchni płytek krwi) rozpuszczalny fibrynogen przekształca się w monomery fibryny, które następnie łączą się w nierozpuszczalne polimery tworząc stabilną, usieciowaną matrycę fibrynową. Matryca ta czopuje naczynia krwionośne zapobiegając krwawieniu.⁸

W dalszej kolejności, przy pomocy cząsteczek adhezyjnych znajdujących się na błonach komórkowych, do matrycy fibrynowej przyczepiają się komórki naciekające do rany i uczestniczące w dalszych etapach procesu gojenia się, w tym: leukocyty, fibroblasty oraz komórki śródbłonna i mięśnie gładkie naczyń krwionośnych.⁹⁻¹⁵ W konsekwencji, czop fibrynowy zatyka naczynia krwionośne zapobiegając krwawieniu i równocześnie stanowi początkowe rusztowanie, na którym mocowane są komórki uczestniczące w fazie zapalenia oraz komórki biorące udział w początkowej fazie proliferacji ran.⁹⁻¹⁵

Po zatrzymaniu krwawienia następuje stopniowa fibrynoliza skrzepu, która jest przeprowadzana przez metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. matrix metalloproteinases) oraz przez plazaminę wydzielaną przez komórki śródbłonna naczyń krwionośnych.^{16,17} Równocześnie rozpoczyna się proliferacja komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, która następuje pod wpływem czynników wzrostowych wydzielanych przez płytki krwi oraz neutrofile i makrofagi uczestniczące w fazie zapalenia, takich jak: czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor) oraz czynnik wzrostu fibroblastów-2 (FGF-2, ang. fibroblast growth factor).^{18,19}

Po około 5 dniach od urazu do macierzy fibrynowej migrują fibroblasty, które pod wpływem PDGF, TGF- β i fibryny zaczynają się rozrastać wydzielając czynniki działające chemotaktycznie w stosunku, do kolejnych fibroblastów. Pod wpływem tych czynników fibroblasty napływają intensywnie do łożyska rany gdzie wytwarzają składniki ECM, która ostatecznie zastępuje prowizoryczną matrycę fibrynową.^{20,21}

Faza zapalenia (1 – 6 dzień)

Proces zapalny jest inicjowany natychmiast po zranieniu i rozpoczyna się przenikaniem leukocytów do środowiska rany. Część leukocytów jest obecna w miejscowej tkance jako komórki rezydujące, jednak większość leukocytów jest rekrutowana do rany z krwi. Leukocyty przedostają się do rany w wyniku diapedezy (migracji) z naczynia do pozanaczyniowej przestrzeni rany. Migracja leukocytów przez komórki śródbłonka lub między połączeniami komórek śródbłonka następuje pod wpływem czynników zapalnych, w tym cytokin wytwarzanych przez komórki tuczne i płytki krwi. W proces migracji zaangażowane są również selektyny, integryny, receptor hialuronianu CD44, cząsteczki adhezji komórkowej i proteazy.^{22–24}

Komórki zapalne: Leukocyty są przyciągane do obszaru rany przez specyficzne receptory na powierzchni aktywnych płytek krwi, przez cząsteczki adhezyjne osadzone na tymczasowej macierzy fibrynowej oraz przez chemokiny znajdujące się w obszarze rany.^{25,26}

Neutrofile: Pierwszymi leukocytami, które napływają do rany są neutrofile, których podstawową rolą jest niszczenie drobnoustrojów poprzez fagocytozę i degradację lizosomalną.²⁷ Neutrofile są dominującymi komórkami zapalnymi w ranie przez pierwsze 3 dni stanu zapalnego, a ich liczba osiąga szczyt po 48 godzinach od zranienia.²⁸ Rekrutacja neutrofili następuje pod wpływem produktów bakteryjnych oraz wskutek działania chemokin wytwarzanych przez miejscowe komórki tuczne, takich jak: interleukina-8 (IL-8, ang. interleukine), onkogen związany ze wzrostem- α (GRO- α , ang. growth-related oncogene- α) i monocytny, chemotaktyczny czynnik białkowy-1 (MCP-1, ang. monocyte chemoattractant protein-1).²⁶ Po dotarciu do rany neutrofile przeprowadzają fagocytozę resztek bakteryjnych oraz wzmacniają odpowiedź zapalną uwalniając reaktywne formy tlenu (wolne rodniki), proteazy i eikozanoidy (prostaglandyny, tromboksany, leukotrieny), które w fazie zapalnej kontrolują agregację trombocytów, temperaturę tkanki i przepływ krwi.^{27,29,30}

Neutrofile działają przeciwbakteryjnie oraz modulują odpowiedź zapalną za pośrednictwem granulek cytoplazmatycznych. W procesie degranulacji neutrofile najpierw wydzielają granulki peroksydazo-ujemne zawierające MMP-8, -9 i -25, które rozkładają składniki macierzy takie jak: proteoglikan lamininy, fibronektyna i kolagen. Celem miejscowego rozpadu macierzy jest stworzenie dostępu przeciwdrobnoustrojowego do rany

oraz zwiększenie nacisku na sąsiednie naczynia limfatyczne i włosowate, co prowadzi do miejscowego zapadnięcia się naczyń krwionośnych. W wyniku tego procesu odcięte są drogi ucieczki bakterii z obszaru rany co zapobiega infekcji ogólnoustrojowej. Następnie z cytoplazmy neutrofilii uwalniane są granulki peroksydazo-dodatnie, które zawierają czynniki przeciwdrobnoustrojowe (m.in. α -defensyny i mieloperoksydazę). Dojrzałe neutrofile po przeprowadzeniu fagocytozy i zabiciu bakterii ulegają apoptozie (czyli zaprogramowanej śmierci) i stanowią podstawowy składnik komórkowy wydzielin ropnej.^{31,32}

Makrofagi: Jako następne do rany napływają monocyty, które są rekrutowane poprzez chemokiny, cytokiny, drobnoustroje i neutrofile ulegające apoptozie.³³ Monocyty w pozanaczyniowej przestrzeni rany przekształcają się w makrofagi, które kontynuują oczyszczanie poprzez fagocytozę macierzy i szczątków komórkowych pozostawionych przez neutrofile. Największą liczbę makrofagów w ranie stwierdza się w 72 i 84 godzinie po zranieniu i są one wówczas dominującą populacją komórek w ranie. Następnie ich liczba stopniowo zmniejsza się w miarę napływu do rany fibroblastów uczestniczących w fazie proliferacji.³⁴

Makrofagi cechują się adaptacją funkcjonalną, czyli przechodzą przez wiele różnych fenotypów funkcjonalnych i dostosowują się do zmieniającego się mikrośrodowiska rany.³⁵⁻³⁸ Na etapie zapalenia makrofagi są stymulowane przez prozapalny czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α , ang. tumor necrosis factor- α ,) i przeprowadzają fagocytozę oraz wydzielają czynniki wzmacniające proces zapalny. W końcowej fazie zapalenia makrofagi są hamowane przez interleukiny przeciwzapalne (w tym: IL-4, IL-10) i wydzielają czynniki wzrostu stymulujące proliferację rany.^{39,40} Natomiast w końcowym etapie fazy odbudowy makrofagi reagują na interferon- γ (IFN- γ), wytwarzając trombospondynę i chemokiny, które zmniejszają proliferację komórek śródbłonna naczyń i hamują angiogenezę.⁴¹⁻⁴³

W związku z powyższym, makrofagi są aktywne zarówno w fazie zapalenia, jak i proliferacji ran i wydzielają wiele czynników stymulujących i regulujących proces gojenia się ran, w tym: cytokiny, czynniki wzrostu, składniki dopełniacza, reaktywne formy tlenu, prostaglandyny, proteazy (w szczególności MMP-1), inhibitory proteaz, białko regulowane tlenem-150 (OGP-150, ang. oxygen-regulated protein-150) oraz produkty ECM.^{33,44} Wśród cytokin i czynników wzrostu wytwarzanych przez makrofagi znajdują się TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- α , TGF- β , PDGF, VEGF, FGF-2 oraz insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1, ang. insulin-like growth factor).^{45,46} We wczesnej fazie zapalenia makrofagi wytwarzają

również tlenek azotu (NO, ang. nitric oxide), który przyczynia się do rozszerzenia naczyń krwionośnych.⁴⁷⁻⁴⁹

Komórki tuczne: Komórki tuczne są rezydującymi komórkami obronnymi zlokalizowanymi w tkankach. Charakteryzują się rozległą cytoplazmą wypełnioną dużymi ziarnistościami, zawierającymi wiele czynników regulujących gojenie się ran.⁵⁰⁻⁵² Natychmiast po uszkodzeniu, komórki tuczne wydzielają czynniki regulujące przepływ krwi, w tym: histaminę, serotoninę oraz spazmogeny mięśni gładkich.^{50,53} Komórki tuczne uczestniczą także w dalszych etapach gojenia się ran wydzielając czynniki wzmacniające i hamujące proces zapalny oraz czynniki stymulujące angiogenezę i odbudowę ran, w tym: enzymy proteolityczne (typtazy, chymazy i karboksypeptydazy), cytokiny prozapalne (TNF- α , IL-1 α i IL-1 β , IL-6, IL-18), cytokinę przeciwzapalną (IL-10), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, IFN- α , - β i - γ , chemokiny oraz czynniki wzrostu (TGF- β VEGF, FGF-2).⁵⁰

Faza odbudowy (od 4 do 14 dnia)

Charakterystyczną cechą fazy odbudowy (prolifracji) jest pojawienie się ziarniny, która składa się z makrofagów, fibroblastów, rozwijających się naczyń krwionośnych, niedojrzałego kolagenu i nowo tworzącego się ECM. W fazie naprawy dominującymi komórkami są fibroblasty, które wspomagają angiogenezę oraz uczestniczą w wytwarzaniu ECM i w kurczeniu się rany. Końcowym etapem proliferacji ran jest naskórkowanie, w trakcie którego keratynocyty migrują z brzegów rany i ostatecznie pokrywają ranę cienką warstwą komórkową.

Neowaskularyzacja: Istotnym etapem procesu odbudowy ran jest tworzenie się nowych naczyń krwionośnych w tkance ziarninowej (w rozwijającej się ECM) co zapewnia dopływ krwi do nowo powstającej tkanki.⁵⁴ Naczynia krwionośne powstają na drodze waskulogenezy i angiogenezy.⁵⁴⁻⁵⁶ W procesie waskulogenezy naczynia krwionośne tworzą się z komórek progenitorowych śródbłonna pochodzących ze szpiku kostnego (BMD EPC, ang. bone marrow-derived endothelial progenitor cel), które krążą we krwi i mogą różnicować się w tkance dając początek nowej sieci naczyniowej.^{55,56} Zaobserwowano, że w tkance ziarninowej szybko gojących się ran liczba BMD EPC jest znacznie większa w porównaniu do ran gojących się z opóźnieniem.⁵⁷ Natomiast angiogeneza polega na migracji i proliferacji sąsiednich dojrzałych komórek śródbłonna.⁵⁴ Oba procesy są wspomagane przez komórki tuczne, makrofagi i fibroblasty wydzielające czynniki wzrostu i proteazy, które stymulują przebudowę ECM w celu utworzenia kanalików śródbłonna naczyń krwionośnych.⁵⁴

Sygnaty do neowaskularyzacji powstają natychmiast po zranieniu i są wzmacniane w fazie zapalnej.^{54,58} Pierwszym sygnałem stymulującym waskulogenezę i angiogenezę jest niedotlenienie w miejscu rany.⁵⁴ W wyniku niedotlenienia aktywowane są makrofagi, które wytwarzają syntazę tlenku azotu (NOS, ang. nitric oxide synthases), pod wpływem której w tkankach (m.in. w śródbłonku naczyń krwionośnych) powstaje NO odgrywający kluczową rolę w uwalnianiu BMD EPC ze szpiku kostnego. Komórki te następnie są naprowadzane na niedotlenioną ranę przez chemokinę SDF-1 α .⁵⁸⁻⁶⁰

Podstawowymi angiogenetycznymi czynnikami wzrostu są: VEGF, FGF, PDGF i TGF- β .⁶¹⁻⁶⁴ Czynnikiem wzrostu śródbłonka naczyń krwionośnych (VEGF) wytwarzany jest przez fibroblasty, komórki śródbłonka, keratynocyty, komórki tłuszczne i makrofagi.⁶⁵ Stymuluje on proliferację, migrację i przeżycie komórek śródbłonka poprzez regulację w górę białka antyapoptotycznego Bcl-2.⁶⁶⁻⁶⁸ Czynniki wzrostu fibroblastów (FGF-1 i FGF-2) są wytwarzane przez komórki zapalne, komórki śródbłonka i fibroblasty. Stymulują one proliferację, różnicowanie i migrację komórek śródbłonka.⁶⁹⁻⁷¹ Transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β) stymuluje migrację i różnicowanie się komórek nabłonka, jak również tworzenie się kanalików naczyń i ich osadzanie w ECM.⁷²⁻⁷⁴ Transformujący czynnik wzrostu- β wpływa również pośrednio na angiogenezę, ponieważ zwiększa rekrutację komórek zapalnych do rany i stymuluje uwalnianie przez te komórki VEGF, PDGF i FGF, pobudza również fibroblasty do wydzielania VEGF.⁷⁵⁻⁷⁸

Fibroblasty: Fibroblasty dostają się do obszaru rany poprzez migrację z sąsiedniej, nienaruszonej skóry właściwej lub na drodze przekształcenia z fibrocytów krążących we krwi. Fibrocyty stanowią subpopulację komórek progenitorowych leukocytów, które pochodzą ze szpiku kostnego. Komórki te dostają się do miejsc uszkodzenia tkanki przez wynaczynienie i w obszarze rany różnicują się w fibroblasty.^{79,80} Fibroblasty pochodzące z fibrocytów występują w większej liczbie w ranach o pełnej grubości i różnicują się w miofibroblasty z większą szybkością niż ich odpowiedniki znajdujące się w skórze.⁸¹

Fibroblasty są przyciągane do środowiska rany przez PDGF wydzielany przez płytki krwi i makrofagi.^{82,83} Uczestniczą one w tworzeniu i przebudowie ECM poprzez produkcję i wydzielanie różnych MMP, tkankowych inhibitorów MMP (TIMP, ang. tissue inhibitor of metalloproteinase) seprazy oraz urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA, ang. urokinase-type plasminogen activator).^{84,85} Różnorodność MMP wydzielanych przez fibroblasty zapewnia selektywną degradację poszczególnych składników ECM,

a ekspresja i aktywacja MMP jest ściśle regulowana przestrzennie i czasowo przez TIMP, sygnały chemotaktyczne i wykrywanie składu molekularnego ECM przez fibroblasty.^{86,87}

Po dotarciu do tymczasowej macierzy fibroblasty zaczynają proliferować i odkładać nową, bogatą w kolagen macierz. Oprócz kolagenu, fibroblasty wytwarzają także inne składniki macierzy, takie jak: elastynę, retikulinę, proteoglikany i glikozaminoglikany (GAG).^{88,89} Proliferacja fibroblastów jest stymulowana przez niedotlenienie w ranie oraz przez czynników wzrostu, w tym PDGF, EGF, FGF.⁹⁰⁻⁹⁴ W miarę postępu neowaskularyzacji zmniejsza się niedotlenienie stymulujące proliferację fibroblastów.⁹⁵

Odkładanie macierzy pozakomórkowej: Silnym mediatorem, stymulującym produkcję kolagenu w fazie proliferacji jest również TGF- β . Stymuluje on w ranie produkcję kolagenu typu I oraz typu III.⁹⁶ Typ III jest dominującą formą kolagenu we wczesnej fazie tworzenia się ziarniny. Pojawia się on już w 2 dniu procesu gojenia się rany, a jego maksymalne stężenie w ranie jest obserwowane w 5-7 dniu gojenia się.⁹⁶

Synteza kolagenu zachodzi wewnątrz komórki fibroblastu i skutkuje wydzieleniem z komórki prokolagenu (potrójnej helisy). Następnie (poza fibroblastem), prokolagen jest przetwarzany przez proteazy do nierozpuszczalnego kolagenu fibrylarnego, który jest głównym białkiem nadającym wytrzymałość i strukturę ECM. Średnica kolagenu typu III wynosi tylko około 30% średnicy kolagenu typu I, wskutek czego niedojrzała macierz wykazuje małą wytrzymałość na rozerwanie. Z czasem jednak, w fazie dojrzewania, dominującą formą kolagenu wytwarzanego przez fibroblasty staje się kolagen typu I, który ostatecznie zastępuje typ III.^{97,98}

Elastyna i retikulina zapewniają dodatkowe wsparcie dla rozwijającej się ECM. Elastyna otacza włókna kolagenowe i dzięki swojej falistej sieci zapewnia rozciągliwość i elastyczność macierzy. Retikulina tworzy natomiast bardzo cieką, delikatną i włóknistą sieć, na której dodatkowo odkłada się kolagen.⁹⁹ Oprócz tych włóknistych składników ECM, fibroblasty wydzielają również amorficzną, lepłą substancję składającą się z proteoglikanów i GAG, która zapewnia kształt i integralność rozwijającej się macierzy. Kwas hialuronowy (HA, ang. hyaluronic acid) i niesiarczanowany GAG są najobficiej produkowanymi GAG w okresie od 4 do 5 dnia po uszkodzeniu, a ich produkcja przez fibroblasty jest stymulowana przez TGF- β , FGF, PDGF i EGF.¹⁰⁰⁻¹⁰² Ujemny ładunek HA przyciąga duże ilości wody, powodując obrzęk tkanek, co pozwala na zwiększoną migrację i proliferację komórek. Od 5 do 7 dnia gojenia się rany, głównymi GAG są siarczan chondroityny-4 i siarczan dermatanu. Te siarczanowane GAG

są sztywniejsze niż HA i zapewniają stabilniejszą oraz bardziej sprężystą matrycę, która hamuje migrację i proliferację komórek.¹⁰⁰

Proteoglikany, w tym agrekan, syndekan i dekoryna, syntetyzowane przez fibroblasty jednocześnie z kolagenem, przyspieszają polimeryzację monomerów kolagenu i tworzenie się wiązań krzyżowych między włóknami kolagenu.¹⁰³ Oprócz wsparcia strukturalnego dla ECM, proteoglikany stanowią również rusztowanie, na którym osadzają się czynniki uczestniczące w proteolizie i przebudowie ECM.¹⁰⁴

Miofibroblasty i zamykanie się ran: Niektóre fibroblasty w tkance ziarninowej różnicują się w fenotyp zapewniający odpowiednie napięcie rany, znany jako miofibroblasty. Komórki te mają właściwości kurczliwe. Wydzielają one α -aktynę mięśni gładkich (α -SMA, ang. α -smooth muscle actin) oraz kolagen typu I, a ich transformacja z fibroblastów do miofibroblastów jest stymulowana przez TGF- β .^{105,106} Fibroblasty zaczynają się przekształcać pod wpływem TGF- β w miofibroblasty po wycuciu napięcia mechanicznego w ECM,¹⁰⁶ które pojawia się jako siła trakcyjna podczas migracji fibroblastów, gdy włókna kolagenowe i fibroblasty orientują się równolegle do rany.^{107,108} Transformujący czynnik wzrostu- β jest wytwarzany w fazie zapalnej przez płytki krwi i makrofagi oraz przez fibroblasty, keratynocyty i uszkodzone komórki nabłonkowe we wczesnym etapie proliferacji ran.^{64,109–116}

Migracja keratynocytów: Pokrycie rany przez keratynocyty jest ostatnim etapem fazy proliferacji ran. W ciągu 24 godzin od zranienia fibroblasty wydzielają IL-6 oraz czynniki wzrostu keratynocytów (KGF-1 i KGF-2, ang. keratinocyte growth factor), które stymulują początkową migrację, proliferację i różnicowanie się keratynocytów.¹¹⁷ W symbiotycznym związku keratynocyty zwiększają różnicowanie się fibroblastów w miofibroblasty poprzez uwalnianie TGF- β . Ponadto IL-1 pochodząca z keratynocytów hamuje ekspresję α -SMA, ograniczając tym samym skurcz miofibroblastów. Poprzez ten parakrynyny związek sygnalizacyjny, fibroblasty i keratynocyty synergistycznie kontrolują szybkość skurczu rany i jej pokrycie komórkowe.¹⁰⁹

Keratynocyty migrują z dwóch warstw przylegającego do rany i nieuszkodzonego naskórka, mianowicie z warstwy komórek podstawnych oraz z warstwy komórek ponadpodstawnych. Podczas gdy komórki podstawne migrują wzdłuż tkanki ziarninowej, tworząc systematycznie migrujący język naskórka, komórki z warstwy nadpodstawnej zwiększają migrację poprzez „przeskakiwanie” komórek podstawowych na obwodzie rany.¹¹⁸

Migracja keratynocytów jest stymulowana przez liczne czynniki wzrostu, wydzielane w fazie zapalenia i proliferacji. Głównym regulatorem migracji i proliferacji keratynocytów jest KGF. Jest on wydzielany do rany przez fibroblasty skóry, które zwiększają wydzielanie KGF 100-krotnie w ciągu 24 godzin od zranienia.¹¹⁹ Dodatkowymi czynnikami wzrostu, które stymulują migrację keratynocytów są EGF, TGF- β , insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1, ang. insulin-like growth factor-1) oraz czynnik wzrostu wiążący heparynę podobny do EGF (HB-EGF, ang. heparin-binding EGF-like growth factor) oraz wydzielnicza forma białka prekursorowego amyloidu Alzheimerera. Czynniki te wydzielane są przez: płytki krwi, makrofagi, fibroblasty i same keratynocyty.^{120–124}

W krawędzi wiodącej migrujących keratynocytów występuje duża aktywność proteaz, które degradują i przebudowują ECM na drodze przemieszczania się keratynocytów. Metaloproteinaza-9 rozszczepia kolageny typu IV i VII, które są składnikami błony podstawnej. Plazmina degraduje fibrynę tymczasowej macierzy, a MMP-1 degraduje kolagen typu I i III. Ekspresja tych proteaz występuje równocześnie z ekspresją specyficznych receptorów integryn, co sugeruje współpracę tych czynników w celu skutecznej reorganizacji macierzy i migracji keratynocytów. Gdy keratynocyty zbliżają się do siebie od obwodu rany, kontakt komórka-komórka sygnalizuje zakończenie naskórkowania i migracja keratynocytów zostaje zatrzymana.^{125–129}

Faza przebudowy (od 8 dnia do 1 roku lub dłużej)

Faza przebudowy jest ostatnim etapem gojenia się rany. Obejmuje ona dojrzewanie i reorganizację kolagenu, pod wpływem czynników wzrostu, MMP i odpowiadających im TIMP. W fazie proliferacji niedojrzały kolagen jest odkładany w ranie w sposób losowy. Natomiast w fazie przebudowy poprzez selektywną degradację, wydzielanie i reorganizację kolagenu struktura macierzy przyjmuje formę uporządkowaną i dojrzałą.⁸⁶ W reorganizacji tej uczestniczą czynniki wzrostu oraz siły rozciągające za pośrednictwem integryn.^{130–132}

Z biegiem czasu niedojrzała macierz skórna ulega przebudowie do silniejszej, lepiej zorganizowanej i dojrzałej blizny. W 1 tygodniu po zranieniu blizna ma 37% swojej ostatecznej wytrzymałości; po 3 tygodniach 30%; a po 3 miesiącach i później blizna ma 80% pierwotnej wytrzymałości nieuszkodzonej skóry.¹³³ Ta zmiana wytrzymałości blizny koreluje ze składem i ułożeniem kolagenu w nowej macierzy. Kolagen typu III o mniejszej średnicy, dominujący w tkance ziarninowej, stanowi już tylko 30% kolagenu w nowo tworzącej się ECM. Następnie w fazie dojrzewania kolagen typu III jest stopniowo zastępowany przez grubszy kolagen

typu I, tak aby osiągnąć stan zbliżony do poziomu normalnego zdrowej skóry, który obejmuje 10% kolagenu typu III i 90% kolagenu typu I.¹³⁴ Naciąganie niedojrzałej blizny podczas wykonywania czynności funkcjonalnych jest bodźcem stymulującym integryny, które zmieniają przypadkowe ułożenie włókien kolagenowych w ułożenie uporządkowane, zapewniające odpowiednią wytrzymałość skóry.^{130–132}

Przebudowa blizny jest koordynowana przez ściśle kontrolowaną syntezę i degradację składników macierzy (kolagenu i innych białek) oraz poprzez produkcję i wydzielanie proteaz (MMP i TIMP) przez fibroblasty. We wczesnej fazie przebudowy występuje wzmożona synteza MMP-2, MMP-7 i TIMP-2, która jest skoordynowana z równoczesnym hamowaniem wydzielania MMP-1, MMP-9 i TIMP-1.¹³⁵ Wytwarzanie proteaz oraz ich inhibitorów regulowane jest przez IL-1 oraz TGF- β i PDGF.^{3,136,137}

Produkcja kolagenu przez fibroblasty wzrasta stopniowo do około 21 dni po zranieniu, po czym tempo syntezy kolagenu zmniejsza się wraz z dojrzewaniem kolagenu, zwiększaniem jego wytrzymałości i jego uporządkowanym układaniem się.^{138,139} W fazie przebudowy zmniejsza się również unaczynienie tkanki, które jest zredukowane do poziomu wyjściowego. Zwiększona gęstość naczyń włosowatych, występująca w trakcie ziarninowania, stopniowo zmniejsza się w odpowiedzi na mediatory antyangiogenne, w tym trombospondynę-1.^{140,141} Jest to widoczne, gdy blizna stopniowo zmienia kolor z różowego na biały w końcowym okresie dojrzewania. Dojrzałe blizny naskórkowe są również pozbawione mieszków włosowych i gruczołów potowych, prawdopodobnie z powodu braku populacji komórek macierzystych dla tych przydatków w zregenerowanej skórze właściwej.^{142–144}

1.2. Rany przewlekłe; Odleżyny

Rany przewlekłe nie goją się prawidłowo i stanowią poważny problem zdrowotny, który obejmuje wiele milionów osób na świecie. W ranach przewlekłych występuje nadmierna aktywność cytokin prozapalnych i proteaz, przy równoczesnej zmniejszonej ekspresji cytokin przeciwzapalnych i inhibitorów proteaz. Skutkiem tego jest przewlekły stan zapalny i destrukcja struktur tkankowych.^{145–148} W ranach przewlekłych obserwuje się również zmniejszoną aktywność czynników wzrostowych oraz ich receptorów w błonach komórek zaangażowanych w proces gojenia się ran.^{145–148} Gojenie się ran przewlekłych dodatkowo zaburzą zakażenia, starzenie się komórek, niedobory żywieniowe oraz zaburzenia przepływu krwi.^{145–148} Długotrwała ekspresja cytokin prozapalnych w ranach przewlekłych (w tym IL-1 β

i TNF- α) przedłuża migrację neutrofilii i makrofagów do obszaru rany oraz zwiększa ich aktywność w ranie. W wyniku tego komórki żerne wydzielają nadmierne ilości proteaz, które zaburzają syntezę kolagenu i tworzenie się ziarniny.^{2,3,145}

Główną cytokiną przeciwzapalną w procesie gojenia się ran jest IL-10, której największa aktywność występuje na końcu fazy zapalnej.^{3,149} Badania in vivo prowadzone przez Sato i wsp.¹⁴⁹ u myszy wykazały, że IL-10 hamuje infiltrację neutrofilii i makrofagów do miejsca uszkodzenia oraz zmniejsza ekspresję czynników prozapalnych (głównie TNF- α).¹⁴⁹ Interleukina-10 stymuluje również wzrost i różnicowanie się keratynocytów oraz komórek nabłonka.³ W wyniku niedoboru IL-10 w ranach przewlekłych dochodzi do długotrwałej ekspresji cytokiny prozapalnej TNF- α co zaburza proliferację ran.^{3,149}

Zmniejszona aktywność czynników wzrostu w ranach przewlekłych (w tym: VEGF, PDGF, FGF, IGF-1 i TGF- β 1) utrudnia tworzenie się nowych naczyń krwionośnych i ziarninowanie ran.^{2,150–152} Niedobory PDGF, FGF oraz TGF- β 1 mogą również prowadzić do nadmiernej aktywności MMP^{2,3,153} i zaburzeń syntezy ECM (w szczególności kolagenu typu I).^{2,3,154} Niedobór PDGF, FGF i KGF zmniejsza również chemotaksję keratynocytów¹⁵⁵ i ekspresję α -SMA.¹⁵⁶ Zmniejszona ekspresja FGF i TGF- β 1 zaburza naskórkowanie i bliznowacenie ran.^{2,3} Zaburzenia syntezy i aktywności czynników wzrostowych (w tym: VEGF, PDGF, FGF, IGF-1, TGF- β 1, EGF) oraz ich receptorów upośledzają proliferację, dojrzewanie i przebudowę ran.^{2,3,150–156}

Jednymi z najczęściej występujących ran przewlekłych u ludzi są odleżyny. Zgodnie z wynikami badań epidemiologicznych prowadzonych w różnych krajach na świecie, odleżyny występują u 31 – 52% pacjentów po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego.^{157,158} Na odleżyny cierpi także 4,1 - 32,2% osób w zaawansowanym wieku przebywających w placówkach opieki długoterminowej^{159–161} oraz 13,1 - 45,5% pacjentów na oddziałach intensywnej terapii.^{162,163} Duże ryzyko powstania odleżyn występuje także u osób po operacjach trwających ponad 2 godziny. U tych osób występowanie odleżyn szacuje się na poziomie od 5 do 53%.^{164,165}

Na odleżyny są również narażeni sportowcy poruszający się na wózkach inwalidzkich. Badania epidemiologiczne przeprowadzone przez Rice i wsp.¹⁶⁶ wykazały, że na odleżyny cierpią zawodnicy uprawiający wyścigi na wózkach inwalidzkich, uczestniczący w paraolimpiadach.

U tych zawodników odleżyny powstają najczęściej w obszarze podudzia, nad kością piszczelową. Ich przyczyną jest długotrwały ucisk skóry podczas klęczenia na płycie, w którą wyposażony jest wózek i w której to pozycji zawodnicy przebywają w czasie treningów i zawodów. Według Rice i wsp.¹⁶⁶ występowanie odleżyn u zawodników uprawiających wyścigi na wózkach zostało oszacowane na poziomie 7% w populacji 291 sportowców uczestniczących w badaniu. Derman i wsp.¹⁶⁷ wykazali występowanie uszkodzeń skóry (w tym odleżyn) u 20% zawodników uczestniczących w igrzyskach paraolimpijskich w 2012 roku.

Zgodnie z wynikami badań Theisen¹⁶⁸ oraz Fagher i wsp.¹⁶⁹ przeprowadzonych u sportowców z uszkodzonym rdzeniem kręgowym oraz u zawodników po amputacji kończyn ryzyko wystąpienia odleżyn i owrzodzeń jest szczególnie wysokie podczas uprawiania zimowych dyscyplin sportowych, jest to spowodowane zmniejszeniem pobudliwości receptorów czuciowych oraz kontroli naczyniowej w wyniku działania zimna. Dodatkowo u osób z uszkodzonym rdzeniem kręgowym odleżyny mogą pojawić się w wyniku przebywania przez długi czas w jednej pozycji podczas kilkudniowych zawodów oraz przy noszeniu nowej odzieży. Zwiększone ryzyko wystąpienia odleżyn u sportowców z niepełnosprawnościami istnieje także podczas długich podróży, gdzie uniemożliwiona jest zmiana pozycji ciała.^{168,169}

Odleżyny powstają wskutek długotrwałego ucisku tkanek, który prowadzi do zmniejszenia czynnego ukrwienia tętniczego i zwiększenia biernego przekrwienia żylnego. Skutkiem tego jest niedotlenie tkanek, przewlekły stan zapalny oraz martwica tkanek. Kurose i wsp.¹⁴⁷ w badaniu in vivo, w skórze zwierząt eksperymentalnych poddanych długotrwałej kompresji odnotowali zwiększone wydzielanie czynników prozapalnych oraz czynników indukujących apoptozę, w tym IL-1 β , IL-6, TNF- α i MMP-3. Podobne wyniki odnotowali także Jiang i wsp.,¹⁴⁸ którzy w odleżynach III i IV stopnia u ludzi, w porównaniu do skóry zdrowych osób, stwierdzili zwiększoną infiltrację cytokin prozapalnych (IL-1 β , TNF- α) i kaspazy-3 oraz zmniejszone stężenie kolagenu i czynników wzrostowych (FGF, VEGF).

Stopień zaawansowania odleżyn jest zróżnicowany. Zgodnie z 4-stopniową klasyfikacją odleżyn zaproponowaną przez European Pressure Ulcer Advisory Panel (EPUAP), National Pressure Injury Advisory Panel (NPIAP) i Pan Pacific Pressure Injury Alliance (PPPIA)¹⁷⁰ odleżynę I stopnia cechuje nieblednący rumień. Ciągłość skóry jest zachowana, ale skóra ma podwyższoną temperaturę i jest zaczerwieniona. Zaburzone jest czucie skórne. Próg pobudliwości bólowej skóry jest na ogół podwyższony i zmieniona jest konsystencja tkanki. W przypadku odleżyny II stopnia grubość skóry jest zmniejszona i występuje częściowe

uszkodzenie naskórka lub nawet skóry właściwej. Mogą występować pęcherze, otarcia powierzchniowe lub owrzodzenia. Skóra ma wygląd płaskiego uszkodzenia z czerwono-różowym dnem, ale jeszcze nie występuje martwica odłączająca się od tkanki zdrowej. Odleżynę III stopnia cechuje utrata całkowitej grubości skóry, widoczna jest tkanka podskórna, ale mięśnie jeszcze nie są odsłonięte. Często występuje wilgotna martwica tkanki podskórnej nieprzekraczająca powięzi. W przypadku odleżyny IV stopnia występuje głębokie zniszczenie tkanek, widoczne są mięśnie, ścięgna, a nawet kości. Może występować wilgotna martwica.

1.3. Elektrostymulacja w leczeniu ran przewlekłych

Leczenie odleżyn jest na ogół długotrwałe i wymaga stosowania różnego rodzaju środków, często kosztownych. Dlatego wciąż poszukuje się nowych metod leczniczych, które nie wymagają dużych nakładów finansowych i mogą być stosowane w warunkach domowych przez pacjenta lub jego opiekunów. W ostatnich latach coraz częściej bada się możliwości wykorzystania w leczeniu ran przewlekłych metod fizykalnych, w tym elektrostymulacji (ES).

Wpływ prądów elektrycznych na mechanizmy leżące u podstaw gojenia się ran

Poznane są już niektóre mechanizmy, poprzez które prądy elektryczne pobudzają gojenie się ran, wciąż jednak istnieje potrzeba kontynuowania badań, szczególnie w warunkach klinicznych, których wyniki pozwolą ustalić wpływ prądów elektrycznych na proces gojenia ran przewlekłych u ludzi. Endogenne sygnały elektryczne występujące w ranach u zwierząt i u ludzi zaobserwowano już wiele lat temu.¹⁷¹ W ostatnich latach, wykorzystując nowoczesne techniki pomiarowe, potwierdzono występowanie naturalnego, endogennego pola elektrycznego w obrębie ran i odczytano jego wartości.¹⁷² Opisano również niektóre mechanizmy molekularne indukowane w uszkodzonej tkance przez endogenne prądy elektryczne. Wyniki badań potwierdziły, że naskórek nieuszkodzonej skóry jest spolaryzowany ujemnie względem głębszych warstw skóry i wartość tego potencjału wynosi średnio -23,4 mV.¹⁷¹ Ten potencjał skórny (ang. transepithelial potential) gwarantuje prawidłowe funkcjonowanie skóry. Jest on utrzymywany aktywnie poprzez pompę jonową, a dodatkowo duża oporność elektryczna naskórka utrudnia wyrównanie się różnicy potencjałów pomiędzy naskórkiem i skórą właściwą. Po uszkodzeniu skóry i zdarciu naskórka obszar rany staje się elektrododatni względem ujemnie spolaryzowanego naskórka wokół rany. W wyniku powstania różnicy potencjałów pomiędzy obszarem rany, a zdrową skórą wokół rany tworzy się pole elektryczne, w obrębie którego przepływa endogenne prądy elektryczne, tzw. „prąd uszkodzenia”

(ang. injury current). Natężenie „prądu uszkodzenia” jest największe przy brzegach rany (około $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) i zmniejsza się w kierunku środka rany.^{172,173} Prąd ten pobudza procesy komórkowe leżące u podstaw gojenia się ran.^{172,173}

Okazuje się, że prądy elektryczne aplikowane egzogenicznie również mogą stymulować procesy zachodzące w trakcie gojenia się ran. W badaniach *in vitro* pod wpływem prądu stałego oraz prądów zmiennych odnotowano migrację komórek biorących udział w gojeniu się ran. Mianowicie, makrofagi¹⁷⁴ i neutrofile¹⁷⁵ przemieszczają się w kierunku anody co reaktywuje autolizę tkanki martwiczej i fazę zapalenia. Do anody podążają również fibroblasty i komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych co ma istotne znaczenie w procesie angiogenezy i ziarninowania.¹⁷⁶ Natomiast przez katodę przyciągane są komórki nabłonka naczyń krwionośnych,¹⁷⁶ fibroblasty^{177,178} i keratynocyty.¹⁷⁹ Katoda pobudza również syntezę protein i DNA w kulturach ludzkich fibroblastów.¹⁸⁰ Biorąc powyższe pod uwagę, uważa się, że katoda może pobudzać proliferację ran.^{176–180}

Prądy elektryczne mogą również wpływać na mechanizmy zwiększający przepływ krwi w obszarze ran. Efekty te były obserwowane w badaniach *in vivo* u zwierząt,¹⁸¹ w badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych u zdrowych ludzi^{182,183} oraz w badaniach klinicznych.^{184–186} Badania przedkliniczne przeprowadzone u zdrowych ludzi^{182,183} wykazały, że prąd przemienny (250 μs ; 30 Hz)¹⁸² oraz katodowy prąd impulsowy (1 ms; 6 Hz)¹⁸³ zwiększają uwalnianie tlenu azotu z śródbłonka naczyń krwionośnych skóry co przyczynia się do rozszerzenia naczyń krwionośnych. Obserwacje te zostały również potwierdzone w badaniach klinicznych przeprowadzonych przez Mohajeri-Tehrani i wsp.¹⁸⁴ Badacze Ci odnotowali zwiększone stężenie tlenu azotu w surowicy krwi u pacjentów, u których przy pomocy prądu stałego ($0,12 \text{ mA}/\text{cm}^2$) leczono owrzodzenia cukrzycowe stopy. Zabiegi ES były wykonywane przez 4 tygodnie, 60 minut dziennie, 3 razy w tygodniu z użyciem katody jako elektrody leczniczej układanej na powierzchni owrzodzeń.¹⁸⁴

Uważa się, że prądy elektryczne mogą powodować rozszerzenie naczyń krwionośnych wpływając na receptory waniloidowe-4 kanałów wapniowych aktywowanych przejściowym potencjałem elektrycznym (ang. transient receptor potential vanilloid-4 channels; TRPV-4). Receptory te są zlokalizowane w naczyniach krwionośnych i reagują na zmiany potencjału błonowego. Zdaniem badaczy^{187,188} egzogeniczny prąd elektryczny powodując depolaryzację kanałów TRPV-4 zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych dla jonów wapnia. Przy zwiększonym stężeniu jonów wapnia w nabłonku naczyń krwionośnych aktywowana jest

syntaza tlenku azotu i zwiększa się wydzielanie tlenku azotu w naczyniach krwionośnych, co prowadzi do rozluźnieniem mięśni gładkich naczyń krwionośnych i zwiększenia przepływu krwi w kapilarach.^{187,188}

Badania in vivo u zwierząt¹⁸¹ oraz badania kliniczne¹⁸⁵ wskazują również, że prądy elektryczne aplikowane z natężeniem poniżej progu pobudliwości mięśni szkieletowych przyczyniają się do zwiększenia gęstości kapilar w ranach u zwierząt¹⁸¹ i ludzi.¹⁸⁵ Borba i wsp.¹⁸¹ odnotowali zwiększenie gęstości kapilar we wczesnym okresie gojenia się ran eksperymentalnych u szczurów pod wpływem anodowego, prądu impulsowego o częstotliwości 7,7 Hz, aplikowanego przez 30 minut dziennie, w ciągu 7 kolejnych dni. Natomiast Junger i wsp.¹⁸⁵ w badaniu klinicznym stwierdzili zwiększenie gęstość kapilar w owrzodzeniach żylnych podudzi pod wpływem prądów impulsowych stosowanych przez 30 minut na dzień, średnio przez 38 dni. Czas trwania impulsu wynosił 140 μ s i prądy były aplikowany z natężeniem 630 μ A przy częstotliwości 128 Hz oraz z natężeniem 315 μ A przy częstotliwości 64 Hz. Przez pierwsze 14 dni rany poddawano stymulacji katodowej. A następnie, w zależności od postępów gojenia ran co 3 – 10 dni stosowano na przemian stymulację anodową i katodową. W owrzodzeniach żylnych poddanych ES autorzy zaobserwowali także zwiększoną perfuzję krwi w naczyniach skórnych oraz zwiększone ciśnienie parcjalne tlenu (TcPO₂).¹⁸⁵

Prądy elektryczne mogą także zmieniać ekspresję cytokin prozapalnych^{189,190} i przeciwzapalnych¹⁹⁰ w ranach. W badaniu in vivo, przeprowadzonym przez Gürgen i wsp.¹⁸⁹ pod wpływem prądu przemiennego (2 Hz; 250 μ C/s; 15 min), dawkowanego poniżej progu pobudliwości mięśni szkieletowych, odnotowano zmniejszenie stężenia cytokin prozapalnych (IL-1 β , TNF- α , IL-6) w ranach skórnych u szczurów. Odziaływanie prądów elektrycznych na stężenie czynników pro- i przeciwzapalnych obserwowano także we krwi u ludzi.¹⁹⁰ Karavidas i wsp.¹⁹⁰ przeprowadzili badanie kliniczne u chorych z przewlekłą niewydolnością serca, u których zastosowali ES mięśni czworogłowego uda i trójgłowego łydki obu kończyn dolnych. Stymulacje wykonywano prądem przemiennym o częstotliwości 25 Hz, który wywoływał skurcze tężcowe mięśni (5 sekund skurcz, 5 sekund przerwa). Zabiegi były wykonywane przez 30 minut dziennie, przez 4 tygodnie. Po zakończeniu terapii we krwi u chorych odnotowano zmniejszenie stężenia TNF- α , rozpuszczalnej, międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (ang. soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1) oraz rozpuszczalnej, naczyniowej

cząsteczki adhezyjnej-1 (ang. circulating vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1). Zwiększył się także stosunek cytokiny przeciwzapalnej IL-10 do prozapalnej TNF- α .

Prądy elektryczne zwiększają także syntezę czynników stymulujących proliferację ran, w tym czynników angiogenetycznych^{184,191-199} oraz przyspieszają dojrzewanie i przebudowę ran.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Efekty te były obserwowane w badaniach przedklinicznych, w tym w badaniach *in vitro*,^{196,197,200} *in vivo* przeprowadzonych u zwierząt^{191,193,195,201} oraz u zdrowych ludzi,^{198,199} jak również w jednym badaniu klinicznym przeprowadzonym u chorych z owrzodzeniami cukrzycowymi.¹⁹⁴

W badaniach *in vitro*^{196,197,200} pod wpływem prądu stałego płynącego w obszarze pola elektrycznego o natężeniu porównywalnym do endogennego pola elektrycznego powstającego w obszarze ran (50 - 200 mV/mm) stwierdzono zwiększone uwalnianie IL-8¹⁹⁷ i VEGF^{196,197} przez komórki nabłonka naczyń krwionośnych pobrane od ludzi oraz zwiększone wydzielanie FGF-1 i FGF-2 w kulturach ludzkich fibroblastów.²⁰⁰

Kanno i wsp.¹⁹¹ w badaniu *in vivo* pod wpływem prądu przemiennego (300 μ s; 50 Hz) zaobserwowali zwiększenie stężenia VEGF i gęstości kapilar w mięśniach u szczurów, które wcześniej doprowadzono do stanu niedokrwienia. Prąd dawkowany był poniżej progu pobudliwości mięśni, bez przerwy, przez 5 dni.¹⁹¹ W dwóch badaniach *in vivo*, przeprowadzonym przez zespół Asadi i wsp.^{193,195} stwierdzono zwiększone uwalnianie VEGF¹⁹³ i TGF- β 1¹⁹⁵ w ranach skórnych u szczurów poddanych ES katodowej prądem stałym (600 μ A; pole powierzchni elektrody leczniczej = 3 cm²) przez 60 minut na dzień, w ciągu 7 kolejnych dni. Kim i wsp.²⁰¹ w badaniu *in vivo* pod wpływem ES wysokonapięciowej (140 μ s; 100 Hz, 35-50 V; 40 min/dzień; 7 dni) odnotowali zwiększone wydzielanie TGF- β 1, kolagenu typu 1 oraz α -SMA w ranach eksperymentalnych u szczurów. Elektrostymulacja była wykonywana na poziomie minimalnych, wyczuwanych palpacyjnie skurczów mięśniowych. Przez pierwsze 3 dni rany stymulowano katodą, a przez kolejne 4 dni - anodą.²⁰¹

Ud-Din i wsp.¹⁹⁸ oraz Sebastian i wsp.¹⁹⁹ zastosowali ES na ranach eksperymentalnych wykonanych u zdrowych ochotników. W obu badaniach zastosowano modulowany prąd przemienny (0,005 mA; 20-80 V; 60 Hz; 60 ms), który aplikowano 4 razy, co drugi dzień, przez 30 minut dziennie. Po ES w ranach odnotowano zwiększone stężenie PDGF,¹⁹⁸ czynników przeciwzapalnych (w tym IL-10 oraz czynnika hamującego migrację makrofagów (ang. macrophage migration inhibitory factor, MMIF),¹⁹⁹ czynników angiogenetycznych (w tym TGF- β 1, MMP-2 i czynnika wzrostu tkanki łącznej CTGF; ang. connective tissue growth

factor, CTGF)¹⁹⁹ oraz czynników odpowiedzialnych za proliferację i przebudowę ran (w tym kolagenu typu IV, fibronektyny i interferonu- γ).¹⁹⁹

Asadi i wsp.¹⁹⁴ przeprowadzili badanie kliniczne, w którym pod wpływem ES katodowej prądem stałym (3,36 mA; pole powierzchni elektrody leczniczej = 6 cm²) odnotowali zwiększenie stężenia VEGF w płynie pobranym z owrzodzeń cukrzycowych na stopie. Zabiegi ES były wykonywane przez 60 minut na dzień, 3 dni w tygodniu przez 4 tygodnie.

Elektrostymulacja odleżyn w badaniach klinicznych

W badaniach klinicznych w leczeniu odleżyn stosowane były głównie prądy zmienne, w tym impulsowe^{186,202–211} i przemiennie.^{212–216} Prądy impulsowe aplikowano w elektrostymulacjach wysokonapięciowych (> 100 V)^{186,202,204–210} i niskonapięciowych (< 100 V).^{203,211} Natomiast prądy przemiennie wykorzystywano w stymulacjach niskonapięciowych.^{212–216} Prądy impulsowe i przemiennie dawkowano zwykle na poziomie przekraczającym próg pobudliwości włókien czuciowych, ale poniżej progu pobudliwości nerwów ruchowych i mięśni.^{186,202–211} W trzech badaniach klinicznych^{212–214} odleżyny leczono prądem przemiennym, który był dawkowany na poziomie przekraczającym próg pobudliwości mięśni.^{212–214} W dwóch badaniach klinicznych^{217,218} w leczeniu odleżyn zastosowano prąd stały o natężeniu w zakresie od 20 do 600 μ A, poniżej progu pobudliwości aksonów czuciowych.

Elektrostymulacja wysokonapięciowa (EWN) w leczeniu odleżyn

Wśród metod elektrycznych wykorzystywanych do leczenia ran przewlekłych u ludzi jest EWN. W badaniach klinicznych EWN była stosowana w leczeniu odleżyn II-IV stopnia,^{202,204–206,208,209} owrzodzeń żylnych podudzi^{219,220} oraz stopy cukrzycowej.²²¹

U pacjentów chorujących na odleżyny, we wszystkich cytowanych badaniach klinicznych w grupach eksperymentalnych oraz w grupach kontrolnych prowadzona była profilaktyka i leczenie odleżyn zgodnie z rekomendacjami klinicznymi, co było uzasadnione względami etycznymi.^{202,204–206,208,209} W grupach kontrolnych była to jedyna forma terapii^{205,206} lub dodatkowo stosowano symulowane zabiegi EWN.^{202,204,208,209} Natomiast w grupach eksperymentalnych dodatkowo zastosowano EWN.^{202,204–206,208,209}

Przebiegi prądowe zastosowane w EWN były podobne. We wszystkich badaniach stosowano impulsy podwójne, szpiczaste i natężenie dawkowano powyżej progu pobudliwości receptorów czuciowych, ale poniżej progu pobudliwości mięśni szkieletowych.^{202,204–206,208,209} W większości badań czas trwania impulsu mieścił się w zakresie od 100 do 154 μ s, a częstotliwość prądu wynosiła 100 - 105 Hz.^{202,204,206,208,209} Do tkanek dostarczano ładunek

elektryczny wynoszący od 250 do 500 $\mu\text{C/s}$.^{202,204,208,209} Elektrostimulacja wysokonapięciowa była przeprowadzana jeden raz dziennie przez 45 - 60 minut, przez 5 – 7 dni w tygodniu, co dawało od 3,75 do 7 godzin EWN na tydzień.^{202,204,206,208,209} Tylko w jednym z cytowanych badań leczenie prowadzono przez 20 kolejnych dni, czyli w przybliżeniu 3 tygodnie.²⁰⁴ Natomiast w pozostałych badaniach^{202,206,208,209} odleżyny leczono przez 6^{206,208,209}, 7,³²⁰² oraz 8 tygodni.²²²

Tylko w badaniu klinicznym przeprowadzonym przez Houghton i wsp.²⁰⁵ zastosowano metodykę EWN odmienną od cytowanych powyżej badań.^{202,204,206,208,209} W badaniu tym EWN była stosowana w nocy, podczas snu pacjentów. Wykorzystywano specjalnie zaprogramowane elektrostymulatory, które uruchamiały się co godzinę dawkując EWN przez 40 minut po czym następowała 20 minutowa przerwa. Stosowano impulsy podwójne, szpiczaste o czasie trwania 50 μs . Przez pierwsze 20 minut zabiegu EWN impulsy były aplikowane z częstotliwością 100 Hz, a przez następne 20 minut z częstotliwością 10 Hz. Zabiegi EWN były wykonywane przez 7 dni w tygodniu, przez 12 tygodni.²⁰⁵

W cytowanych badaniach pod elektrodami umieszczano podkłady z gazy nasączonej solą fizjologiczną lub żel przewodzący prąd elektryczny. Elektroda lecznicza była układana na powierzchni rany, natomiast elektrodę zamykającą obwód elektryczny układano na zdrowej skórze, w odległości przynajmniej 15-20 cm od elektrody leczniczej.^{202,204–206,208,209} Stosowano różną polaryzację elektrody leczniczej. W jednym badaniu²⁰² odleżyny leczono tylko anodą,¹⁸⁷ w dwóch innych badaniach odleżyny były stymulowane wyłącznie katodą.^{188,208} W pozostałych 3 badaniach^{205,206,209} polaryzacja elektrody leczniczej była zmieniana w trakcie terapii, przy czym w 2 badaniach^{206,209} autorzy przez pierwszy tydzień stosowali stymulację katodową, a przez kolejne 5 tygodni stymulację anodową, natomiast w jednym badaniu²⁰⁵ polaryzację elektrody leczniczej zmieniano co tydzień rozpoczynając terapię od stymulacji katodowej.²⁰⁵

Do tej pory w badaniach klinicznych koncentrowano się przede wszystkim na ocenie klinicznych efektów gojenia się odleżyn.^{202,204–206,208,209} We wszystkich badaniach oceniano zmiany pola powierzchni odleżyn, ale tylko w jednym badaniu, przeprowadzonym przez Kloth i Feedar,²⁰² leczenie prowadzone odleżyn IV stopnia w grupie eksperymentalnej (poddanej EWN) było prowadzone aż do ich całkowitego zagojenia się (zmniejszenie pola powierzchni odleżyn o 100%), co trwało średnio 7,3 tygodnia. W podobnym czasie (7,4 tygodnia) odleżyny IV stopnia w grupie kontrolnej zwiększyły się średnio o 28,9%. W pozostałych badaniach^{204–}

^{206,208,209} leczono odleżyny II-III stopnia i terapię prowadzono w poszczególnych badaniach przez 3²⁰⁴, 6^{206,208,209}, 8¹⁸⁶, i 12²⁰⁵ tygodni obserwując po zakończeniu terapii procentowe zmiany pola powierzchni odleżyn w stosunku do stanu sprzed leczenia. W badaniach tych pole powierzchni odleżyn w grupach eksperymentalnych (poddanych EWN) zmniejszyło się średnio o 64,10 – 88,90%.^{204–206,208,209} Natomiast w grupach kontrolnych (w których stosowano tylko leczenie zgodne z rekomendacjami klinicznymi^{206,223} lub dodatkowo stosowano symulowaną EWN^{204,208,209}) pole powierzchni odleżyn zmniejszało się średnio o 36,00 – 54,60%.^{204–206,208,209} We wszystkich cytowanych badaniach klinicznych zmniejszenie pola powierzchni odleżyn w grupach eksperymentalnych było znamienne statystycznie większe ($p < 0,05$) niż w grupach kontrolnych.^{202,204–206,208,209}

Tylko w dwóch badaniach klinicznych^{186,224} poza efektami klinicznymi zmniejszenia pola powierzchni odleżyn autorzy badali również wpływ EWN na mechanizmy podstawowe, leżące u podstaw gojenia się odleżyn, w tym na przepływ krwi w kapilarach skórnych na brzegach odleżyn¹⁸⁶ i na stężenie we krwi cytokin (IL-1 β , TNF- α , IL-10) i czynników wzrostowych (TGF- β 1, IGF-1).²²⁴ Okazało się, że po 2 tygodniach stosowania anodowej oraz katodowej EWN przepływ krwi w kapilarach skórnych na brzegach odleżyn był znamienne statystycznie większy niż w grupie kontrolnej (odpowiednio $p = 0,039$ w grupie poddanej EWN anodowej i $p = 0,0024$ w grupie poddanej EWN katodowej). Po 4 tygodniach przepływy krwi na brzegach odleżyn nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupami ($p > 0,05$). Anodowa i katodowa EWN nie miała natomiast wpływu na stężenie we krwi IL-1 β , TNF- α , IL-10, TGF- β 1 i IGF-1.²²⁴

Do tej pory w warunkach klinicznych nie oceniano wpływu EWN na stężenie czynników biologicznych warunkujących gojenie się ran (w tym czynników wzrostowych i metaloproteinaz) w obrębie odleżyn.

1.4. Nowatorstwo badania

Jest to pierwsze RCT, w którym oceniono i porównano postępy gojenia się odleżyn po 1, 2, 3 i 4 tygodniu stosowania anodowej i katodowej EWN. Jest to również pierwsze RCT, w którym oceniono i porównano ekspresję genów wybranych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-2 i MMP-9) oraz trzech izoform TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) w odleżynach u ludzi poddanych działaniu anodowej i katodowej EWN.

2. CELE BADANIA

Ogólnym celem badania było uzyskanie wiedzy na temat oddziaływania EWN na proces gojenia się odleżyn II-IV stopnia u osób po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego.

Szczegółowymi celami badania były odpowiedzi na następujące pytania:

- 1) Czy i jakie zmiany pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia występują u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego po 1, 2, 3 i 4 tygodniu stosowania anodowej i katodowej EWN?
- 2) Czy i w jaki sposób anodowa i katodowa EWN, wykonywana przez 2 i 4 tygodnie, wpływa na ekspresję genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w odleżynach II-IV stopnia u osób po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego?
- 3) Czy i w jaki sposób anodowa i katodowa EWN, wykonywana przez 2 i 4 tygodnie, wpływa na ekspresję genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 w odleżynach II-IV stopnia u osób po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego?
- 4) Czy u pacjentów po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego wystąpią istotne statystycznie i silne korelacje pomiędzy ekspresją genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9, a zmianami pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia poddanych działaniu anodowej lub katodowej EWN?
- 5) Czy u pacjentów po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego wystąpią istotne statystycznie i silne korelacje pomiędzy ekspresją genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3, a zmianami pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia poddanych działaniu anodowej lub katodowej EWN?

Aplikacyjnym (praktycznym) celem badania było wskazanie możliwości wykorzystania anodowej i katodowej EWN w leczeniu odleżyn II-IV stopnia u osób po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego.

Przyjęto następujące założenia badawcze:

- 1) Anodowa i katodowa EWN stosowane przez 1, 2, 3 i 4 tygodnie w podobnym stopniu przyczynią się do zmniejszenia pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego.

- 2) Anodowa i katodowa EWN stosowane przez 2 i 4 tygodnie w podobnym stopniu zmniejszą ekspresję genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w odleżynach II-IV stopnia u osób po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego.
- 3) Anodowa i katodowa EWN stosowane przez 2 i 4 tygodnie w podobnym stopniu zwiększą ekspresję genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 w odleżynach II-IV stopnia u osób po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego.
- 4) U pacjentów po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego wystąpią istotne statystycznie, silne, ujemne korelacje pomiędzy ekspresją genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9, a zmianami pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia poddanych działaniu anodowej i katodowej EWN.
- 5) U pacjentów po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego wystąpią istotne statystycznie, silne, dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3, a zmianami pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia poddanych działaniu anodowej i katodowej EWN.

3. METODY

Metody i wyniki badania zostały przedstawione zgodnie ze standardami CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials).²²⁵

3.1. Projekt badania

Badanie zaplanowano jako prospektywne, randomizowane badanie kliniczne, przeprowadzone w trzech równoległych grupach obejmujących osoby z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego, u których występowały odleżyny II-IV stopnia. Utworzone zostały dwie grupy eksperymentalne (GE) oraz jedna grupa kontrolna (GK). U pacjentów we wszystkich grupach była stosowana profilaktyka przeciwoleżynowa oraz leczenie odleżyn zgodnie z najlepszymi praktykami klinicznymi.²²⁶ Dodatkowo w jednej GE zastosowano anodową EWN (GEA), a w drugiej GE – katodową EWN (GEK). W GK wykonywane były symulowane zabiegi EWN.

3.2. Zgoda Komisji Bioetycznej i rejestracja badania

Badanie jest częścią obszernego, randomizowanego badania klinicznego, które jest realizowane w Akademii Wychowania Fizycznego w Katowicach od 2014 r. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych w Akademii Wychowania Fizycznego im. J. Kukuczki w Katowicach (nr 4/2014 z dnia 15.05.2014) i zostało prospektywnie zarejestrowane w Australian-New Zealand Clinical Trial Registry (ANZCTR) pod numerem: ANZCTR12615001281583.

Część wyników badania została opublikowana we wcześniejszych artykułach,^{224,227;} w których przedstawiono wyniki zmian pola powierzchni odleżyn po 8 tygodniach leczenia przy pomocy anodowej i katodowej EWN,²²⁷ zmiany przepływów krwi w kapilarach skórnych na brzegach odleżyn uzyskane pod wpływem anodowej i katodowej EWN,²²⁷ zmiany stężeń cytokin (IL-1 β , TNF- α , IL-10) i czynników wzrostowych (TGF- β 1, IGF-1) we krwi u pacjentów z odleżynami II-IV poddanych działaniu anodowej i katodowej EWN oraz ich korelacje ze zmianami pola powierzchni odleżyn.²²⁴ W bieżącym badaniu oceniono zmiany pola powierzchni odleżyn po 1, 2, 3 i 4 tygodniu leczenia przy pomocy EWN anodowej i katodowej. Oceniono również ekspresję genów wybranych MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-9) oraz trzech izoform TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) w odleżynach poddanych anodowej

i katodowej EWN. Zbadano również korelacje pomiędzy ekspresją genów MMP-1, MMP-2, MMP-9, TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 a zmianami pola powierzchni odleżyn.

3.3. Kryteria włączenia i wyłączenia z badania

Do badania włączano dorosłe kobiety i mężczyzn (powyżej 18 lat) z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego (rdzenia kręgowego lub mózgu), u których występowały odleżyny II, III i IV stopnia w lędźwiowo-krzyżowym obszarze tułowia, obręczy biodrowej i kończyn dolnych, u których stwierdzono wysokie ryzyko występowania odleżyn (powyżej 15 punktów w skali Waterlow) i którzy wyrazili zgodę na udział w badaniu.

Do badania nie włączano osób, u których stwierdzono: aktualnie leczone nowotwory złośliwe, alergie na standardowe środki lecznicze, odleżyny kwalifikujące się do leczenia chirurgicznego, odleżyny o polu powierzchni mniejszym niż 0,5 cm², niewyrównana cukrzyca (HbA_{1c} > 7%), odleżyny występujące na podudziach lub stopach u chorych z ostrą i przewlekłą niewydolnością żylną i cukrzycą, miejscowe przeciwwskazania do wykonywania ES (czarna martwica, zapalenie kości, aktualnie leczone lub przebyte nowotwory złośliwe w miejscu wykonywania zabiegów ES, implanty metalowe i elektroniczne w miejscu wykonywania zabiegów ES).

3.4. Informacja dla pacjenta

Wszyscy pacjenci (lub ich prawni opiekunowie) zostali pisemnie poinformowani o możliwości wzięcia udziału w badaniu, oraz o celach i przebiegu badania. Pacjenci (lub ich prawni opiekunowie) otrzymali również pisemną informację o możliwości rezygnacji z udziału w badaniu na każdym z jego etapów, bez konieczności podawania przyczyny. Zostali również pisemnie zapewnieni, że rezygnacja z badania nie będzie miała wpływu na ich dalsze leczenie.

3.5. Przydział do grup (randomizacja)

Pacjenci byli kwalifikowani do badania przez lekarza w oparciu ocenę kliniczną, dokumentację medyczną obejmującą historię choroby oraz wywiad kliniczny. Randomizacja pacjentów do poszczególnych grup następowała losowo, po podpisaniu przez pacjenta (lub prawnego opiekuna) zgody na udział w badaniu. Przed rozpoczęciem badania kierownik badania przygotował 60 (nieprzezroczystych) kopert oraz 60 kartek, na których umieścił litery:

A (20 kartek), B (20 kartek) i C (20 kartek). Litera A oznaczała grupę kontrolną, litera B – grupę eksperymentalną, w której stosowano anodową EWN, a litera C – grupę eksperymentalną, w której stosowano katodową EWN. Następnie koperty i kartki zostały przekazane osobie niezaangażowanej w badanie. Osoba ta w każdej kopercie umieściła po jednej kartce, zakleiła koperty, a następnie ponumerowała koperty losowo od numeru 1 do 60 i przekazała kierownikowi badania. Po zakwalifikowaniu pacjenta do badania kierownik badania otwierał kolejną kopertę i pacjenta kierowano do grupy na podstawie symbolu, który znajdował się na kartce umieszczonej w kopercie.

3.6. Zaślepienie

Zaślepieniem objęto: 1) pacjentów oraz ich opiekunów, jak również wszystkie osoby odwiedzające chorego; 2) lekarza, który kwalifikował pacjentów do badania; 3) personel medyczny zajmujący się profilaktyką przeciwoodleżynową oraz leczeniem i fizjoterapią chorych (w tym lekarzy, fizjoterapeutów i pielęgniarki); 4) osobę oceniającą wielkość pola powierzchni odleżyn; 5) osobę przeprowadzającą badania laboratoryjne ekspresji genów MMP i TGF- β w skrawkach tkanek pobranych z odleżyn; 6) osobę przeprowadzającą analizę statystyczną wyników badania.

Zaślepieniem nie objęto 1) kierownika badania; 2) głównego fizjoterapeuty programującego aparaty do przeprowadzenia aktywnej lub symulowanej EWN.

3.7. Metody diagnostyczne

Dane demograficzne pacjentów oraz informacje dotyczące stanu zdrowia pacjentów uzyskiwano na podstawie dokumentacji medycznej oraz na podstawie wywiadu klinicznego i oceny klinicznej przeprowadzanych przez lekarza i fizjoterapeutę.

3.7.1. Metoda klasyfikacji odleżyn

Odleżyny klasyfikowano w oparciu o czterostopniową skalę NPUAP/EPUAP²²⁸ zgodnie z którą: odleżynę I stopnia cechuje nieblednące zaczerwienienie skóry bez przerwania ciągłości skóry. W przypadku odleżyny II stopnia występuje częściowa utrata grubości skóry właściwej, a w przypadku odleżyny III dochodzi do pełnej utraty grubości skóry. Odleżyna IV stopnia charakteryzuje się rozległymi zniszczeniami tkanek z odstąpieniem mięśni, ścięgien, a nawet kości (z możliwością sięgania zmian w głąb tych struktur).

3.7.2. Ocena klinicznych postępów gojenia się odleżyn.

Kliniczne postępy gojenia się odleżyn oceniano biorąc pod uwagę zmiany pola powierzchni odleżyn (cm²). Pole powierzchni odleżyn mierzono bezpośrednio przed rozpoczęciem leczenia a następnie po zakończeniu każdego z 4 kolejnych tygodni terapii. W przypadku gdy odleżyna zagoiła się przed zakończeniem 4 tygodnia zapisywano datę jej zagojenia.

Pole powierzchni odleżyn mierzono przy pomocy planimetrii. Najpierw wodoodpornym flamastrem obrysowywano kontury odleżyn na przezroczystej, miękkiej i nierozciągliwej folii, którą po odkażeniu układano bezpośrednio na odleżynie. Następnie obrys odleżyny przenoszono na przezroczystą, sztywną folię i przy pomocy planimetru (Mutoh Kurta XGT, Altek, USA) mierzono pole powierzchni ubytku. Planimetr był podłączony do komputera wyposażonego w specjalne oprogramowanie C-GEO (wersja 4.0, Nadowski SoftLine, PL), które umożliwiało obliczanie pola powierzchni odleżyn oraz przechowywanie danych.

3.7.3. Ocena ekspresji mRNA dla MMP i TGF-β

Badanie poziomu mRNA MMP i TGFβ.

U każdego pacjenta skrawki tkanek z odleżyn pobierano trzykrotnie, tj. przed rozpoczęciem leczenia oraz po zakończeniu 2 i 4 tygodnia leczenia. Każdorazowo chirurgicznie pobierano jeden skrawek z brzegu rany, w miejscu, w którym ziarnina przylegała do brzegu rany. Bezpośrednio po pobraniu materiał umieszczano w odczynniku RNeasy Lysis Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i przewożono do zamrażarki w której, w temperaturze -70°C skrawki przechowywano do momentu izolacji całkowitego RNA. Badania molekularne wykonano w Zakładzie Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Homogenizacja zebranego materiału: Przed izolacją całkowitego RNA skrawki tkanek homogenizowano homogenizatorem Polytron® (Kinematics AG, Uster, Switzerland) i w obecności odczynnika TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) .

Izolacja całkowitego RNA: Ekstrakcja całkowitego RNA z zebranych homogenatów odleżyn była pierwszym etapem procedury molekularnej. Proces przebiegał z użyciem 1ml odczynnika TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA. Homogenaty ze

skrawków odleżyn inkubowano przez 5 minut w w temperaturze pokojowej, po czym do homogenatów dodano 200 μ l chloroformu (Sigma- Aldrich, St Louis, USA) i intensywnie wytrząsano przez 15 sekund. Po 2-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, materiał wirowano 15 minut (4°C, 13 000 x g). Górną fazę (z RNA) przenoszono do nowej próbówki, dodawano 500 μ l izopropanolu (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) i dokładnie wymieszano. Po 10-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, próbkę wirowano 10 minut (4°C, 13 000 x g). Supernatant poddano dekantacji, a uzyskany osad RNA przemyto dwukrotnie etanolem (1000 μ l, 75%, Sigma – Aldrich, St Louis, MO, USA). Po każdym przemyciu próbkę wirowano 5 minut (4°C, 13 000 x g). Osad po drugim wirowaniu odsączono i suszono w temperaturze pokojowej.

Analiza jakościowa i ilościowa otrzymanego całkowitego RNA: Otrzymane we wcześniejszym etapie ekstrakty całkowitego RNA zawieszono w 40 μ l wody apirogennej (pozbawionej RNaz). Próbkę poddano worteksowaniu oraz wirowaniu przez 1 minutę przy parametrach 2400 rpm. Następnie odczekano 15 minut i proces wirowania i worteksowania powtórzono jeszcze dwukrotnie. Ocena jakościowa całkowitego RNA przebiegała przy użyciu elektroforezy poziomej. Potrzebny był do tego 1% żel agarozowy barwiony odczynnikami Simply Safe (EurX, Gdańsk, Polska), analizator SUBMINI (K. Kucharczyk T.E., Polska) oraz transiluminator UV BaSys 1D firmy Biotech-Fischer (Perth, Australia). Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym, otrzymany obraz poddano analizie w transiluminatorze, w świetle UV.

Do ilościowej oceny uzyskanego w etapie ekstrakcji całkowitego RNA użyta została metoda spektrofotometryczna (nanospektrofotometr „Nano MN-913”, Maestrogen, Xinzhu, Tajwan) pamiętając, że gęstość optyczna (OD) dla roztworu RNA przy długości fali 260nm wynosi 40 μ l/ml. Współczynnik A260/A280 znajdował się między 1,8 a 2,0, co pozwoliło stwierdzić, że ekstrakcja przebiegła prawidłowo.

RT- qPCR: Do reakcji RT-qPCR użyto zestawu odczynników SensiFAST™ (Bioline, Londyn, UK), zgodnie z zaleceniami producenta. Końcowe stężenie starterów (zarówno sensownego jak i antysensownego) wynosiło 500 nM. Jako gen referencyjny wykorzystano beta-aktynę (ACTB). Warunki termiczne dla jednoetapowego RT-qPCR były następujące: odwrotną transkrypcję przeprowadzano w temperaturze 45 °C, aktywację polimerazy w 95 °C przez 2 minuty, 40 podwójnych cykli składających się z procesu denaturacji w 95 °C przez 5 sekund, hybrydizacji w 60 °C przez 10 sekund, a następnie z końcowego wydłużania

w temperaturze 72 °C przez 5 sekund. Dla każdego z badanych genów użyto określonej pary starterów, co przedstawiono w tabeli nr 1.

Tabela 1. Kolejność nukleotydów w starterach.

Czynnik biologiczny	STARTER FORWARD	STARTER REVERS
MMP-1	5'GCTCATGAACTCGGCCATTCTCTTGGACT 3'	5'CGGGTAGAAGGGATTTGTGCGCATGTA 3'
MMP-2	5' TCCACTGTTGGTGGGAACTCA 3'	5' TGGTCGCACACCACATCTTT 3'
MMP-9	5' TTCTGCCCCAGCGAGAGA 3'	5' GTGCAGGCGGAGTAGGATTG 3'
TGF-β1	5'TGAACCGGCCTTCTGCTTCTCATG3'	5'GCGGAAGTCAATGTACAGCTGCCGC3'
TGF-β2	5'TACTACGCCAAGGAGGTTTACAAA3'	5'TTGTTTCAGGCACTCTGGCTTT3'
TGF-β3	5'CTGGATTGTGGTTCATGCA3'	5'TCCCCGAATGCCTCACAT3'
ACTB	5'TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA3'	5'TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA3'

Legenda: MMP – metaloproteinaza; TGF-β – transformujący czynnik wzrostu-β; ACTB – beta aktyna

RT-qPCR przeprowadzono przy użyciu termocyklera Opticon™ DNA Engine Sequence Detector (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA), który automatycznie wyliczał liczbę kopii cDNA badanych genów. Ilość powstałych amplimerów w przeprowadzonej reakcji była wprost proporcjonalna do intensywności emitowanego przez barwnik SYBR Green I sygnału fluorescencyjnego. Dla każdej z prób została wyznaczona wartość Ct, odpowiadająca numerowi cyklu reakcji PCR, w którym krzywa kinetyki reakcji przecina linię progową poziomu fluorescencji tła. Stężenie wszystkich matryc RNA wynosiło 0,08 µg/µl. Wszystkie próby zostały wykonane w trzech powtórzeniach. Dla każdej badanej próbki oznaczono poziom ekspresji genu ACTB, który stanowił endogenną kontrolę RT-PCR. Każdy przebieg reakcji zakończono analizą krzywej temperatury topnienia w celu potwierdzenia specyficzności amplifikacji i braku dimerów starterów. Ponadto, specyficzność reakcji RT-qPCR potwierdzono techniką elektroforezy w 2% żelu agarozowym. Jako wyniki przyjęto względną ekspresję poszczególnych genów względem genu ACTB.229,230.

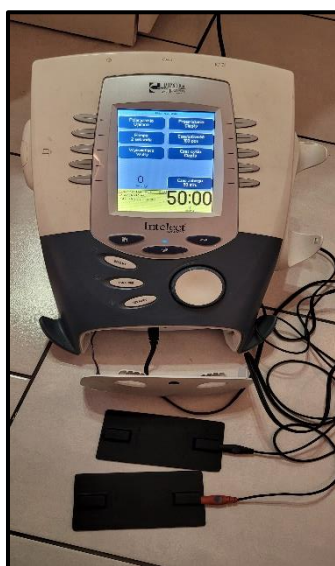
3.8. Metody leczenia

Leczenie zgodne z rekomendacjami klinicznymi. We wszystkich grupach miejscowe leczenie odleżyn było prowadzone zgodnie z zaleceniami lekarskimi i było ono oparte na najlepszych praktykach i rekomendacjach klinicznych.^{170,228,231} Elektrostymulacja aktywna w grupach eksperymentalnych oraz symulowana w GK była wykonywana w przypadkach odleżyn pokrytych martwicą wilgotną martwicą rozpuszczalną oraz odleżyn wykazujących cechy ziarninowania i naskórkowania. W przypadkach gdy odleżyny były pokryte czarną martwicą przed włączeniem chorego do badania tkankę martwiczą usuwano enzymatycznie lub chirurgicznie, w zależności od wskazań lekarskich. Odleżyny zainfekowane przed rozpoczęciem EWN oczyszczano za pomocą antyseptyków, które nie działały cytotoksycznie na zdrowe komórki. W trakcie wykonywania EWN odleżyn nie leczono środkami zawierającymi jony metali (w tym jony srebra i jodu).

Dobierając opatrunki miejscowe brano pod uwagę fazę gojenia się odleżyn, ewentualne występowanie zakażenia oraz ilość wydzieliny z ran. Odleżyny czyste i ziarninujące pokrywano opatrunkami nasączonymi solą fizjologiczną (0,9% NaCl), opatrunkami hydrokoloidowymi oraz piankami poliuretanowymi. Odleżyny pokryte martwicą rozpuszczalną oraz odleżyny cechujące się dużą ilością wydzieliny leczono opatrunkami hydrożelowymi i alginianowymi.

U pacjentów, u których występowała leukocytoza wdrażano antybiotykoterapię zgodnie z antybiogramem uzyskanym z posiewu wymazu pobranego z rany. Wszyscy unieruchomieni pacjenci standardowo otrzymywali enoksyparynę. Pacjenci, u których stwierdzono zaburzenia odżywienia otrzymywali wsparcie i leczenie żywieniowe. Pacjentom tym pomagano spożywać pokarmy i napoje w trakcie posiłków oraz ściśle kontrolowano u nich ilość i jakość spożywanych posiłków oraz płynów zgodnie z zaleceniami dietetyka. W razie potrzeby pacjentom tym podawano suplementy żywieniowe. Leczenie żywieniowe, prowadzone było doustnie, dożylnie i dojelitowo, w zależności od potrzeb.

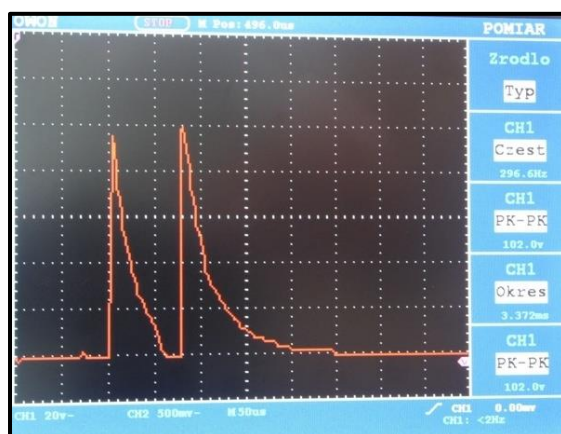
Elektrostymulacja wysokonapięciowa aktywna w grupach eksperymentalnych oraz symulowana (w GK) była wykonywana przy pomocy tego samego aparatu Intellect Advanced Combo (DJO Global, Vista, CA, USA) (rycina 1).



Rycina 1. Aparat do elektrostymulacji wraz z kompletem elektrod wykonanych z przewodzącej gumy węglowej (fotografia własna).

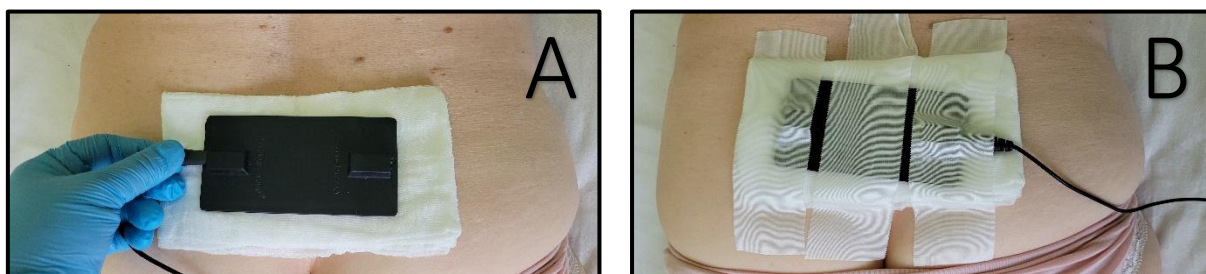
Aparat do ES był wyposażony w dwa obwody elektryczne, tj. obwód aktywny i nieaktywny. Do obwodu aktywnego podłączano elektrody w trakcie wykonywania aktywnej EWN. Natomiast w czasie EWN symulowanej elektrody były podłączane do nieaktywnego obwodu elektrycznego. Miejsce podłączenia elektrod do poszczególnych obwodów elektrycznych było niewidoczne dla osób objętych zaślepieniem.

Aktywna, anodowa i katodowa EWN w grupach eksperymentalnych. Metoda anodowej EWN^{186,202,224} w GEA oraz metoda katodowej EWN^{186,204,208,224} stosowanej w GEK były oparte na badaniach klinicznych prowadzonych przez innych autorów w leczeniu odleżyn^{186,202,204,224} Procedury przeprowadzania EWN w obu grupach eksperymentalnych były takie same, z wyjątkiem polaryzacji elektrody leczniczej. Mianowicie, w GEA jako elektrodę leczniczą stosowano anodę, natomiast w GEK - katodę. Przed każdym zabiegiem EWN odleżyny oczyszczano z pozostałości leków i zanieczyszczeń przy pomocy soli fizjologicznej i środków odkażających. Pomiędzy zabiegami EWN prowadzono leczenie odleżyn opisane powyżej. Elektrostymulację wysokonapięciową wykonywano przy pomocy impulsów elektrycznych podwójnych, szpiczastych, których łączny czas trwania wynosił 154 μ s, a częstotliwość 100 Hz. Wartość szczytowa prądu wynosiła 0,36 A. Natężenie dawковано poniżej progu pobudliwości mięśni szkieletowych. Do tkanek dostarczano ładunek elektryczny wynoszący 360 μ C na sekundę. Przebieg prądu elektrycznego stosowanego w zabiegach ES został przedstawiony na rycinie 2.



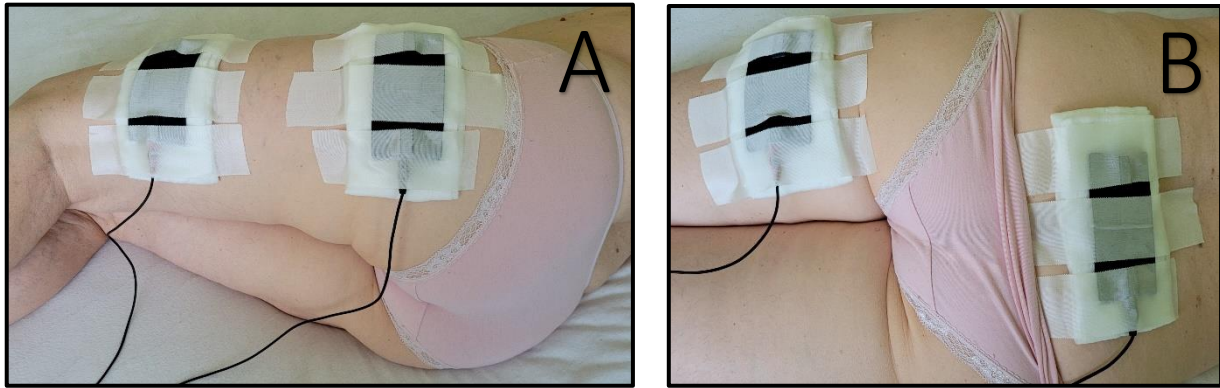
Rycina 2. Przebieg prądu elektrycznego wykorzystywanego w elektrostymulacji wysokonapięciowej (publikacja fotografii za zgodą autorki, Anny Polak).

Zabiegi EWN przeprowadzano elektrodami wykonanymi Dla każdego pacjenta był przeznaczony oddzielny zestaw elektrod. Po każdym zabiegu EWN elektrody wyjąławiano w roztworze dezynfekującym. Elektrody układano na podkładach z jałowej gazy opatrunkowej nasączonej solą fizjologiczną. Elektroda lecznicza (anoda w GEA i katoda w GEK) była układana na powierzchni odleżyny, której dno było najpierw dokładnie wypełnione gazą nasączoną solą fizjologiczną, a następnie było przykryte wilgotną gazą (również nasączoną solą fizjologiczną), na której układano elektrodę leczniczą (ryciny 3 a i b).



Rycina 3. a) Układanie elektrody leczniczej na powierzchni odleżyny; b) Mocowanie elektrody leczniczej na powierzchni odleżyny (fotografie własne).

Elektrodę zamykającą obwód elektryczny mocowano plastrami lub pasami do powierzchni ciała pacjenta w odległości przynajmniej 15 cm od elektrody leczniczej. Przykładowe ułożenie elektrod przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4. a) Umieszczenie elektrod w czasie elektrostymulacji odleżyny w okolicy krętarza większego kości udowej; b) Umieszczenie elektrod w czasie elektrostymulacji odleżyny w okolicy kości krzyżowej. W obydwu przypadkach elektrodą leczniczą jest katoda, która jest ułożona na odleżynie. Elektroda zamykająca obwód elektryczny jest ułożona na udzie, poniżej elektrody leczniczej (fotografie własne).

Symulowana EWN w GK. Celem przeprowadzenia EWN symulowanej w GK stosowana była dokładnie taka sama procedura układania i mocowania elektrod jak w grupach eksperymentalnych. Na aparacie były wyświetlane takie same wartości czasu trwania impulsu, częstotliwości i napięcia jak podczas EWN aktywnej z tym, że prąd nie płynął ponieważ elektrody były podłączone do nieaktywnego obwodu elektrycznego.

Czas trwania EWN aktywnej i symulowanej. Czas trwania każdego zabiegu EWN, zarówno aktywnej, jak i symulowanej wynosił 50 minut. Zabiegi przeprowadzano jeden raz dziennie, przez 5 dni w tygodniu (od poniedziałku do piątku), w ciągu 4 kolejnych tygodni.

3.9. Główny efekt końcowy badania

Głównymi efektami końcowymi badania był kliniczny postęp gojenia się odleżyn uzyskany w ciągu 4-tygodniowego leczenia. W celu odpowiedzi na pytania czy leczenie zastosowane w poszczególnych grupach przyczyniło się do zmniejszenia pola powierzchni odleżyn w poszczególnych grupach porównano wielkości pola powierzchni odleżyn (cm^2) po 1, 2, 3 i 4 tygodniu leczenia w stosunku do stanu początkowego. Celem odpowiedzi na pytanie czy i w jakim stopniu anodowa i katodowa EWN przyczyniały się do zmniejszenia pola powierzchni odleżyn pomiędzy grupami porównano procentowe wskaźniki zmian pola powierzchni odleżyn uzyskane po 1, 2, 3 i 4 tygodniu leczenia w stosunku do stanu sprzed leczenia.

3.10. Drugorzędne efekty końcowe badania.

Przyjęto następujące drugorzędne efekty końcowe badania: 1) Zmiany ekspresji mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w odleżynach po 2 i 4 tygodniu leczenia; 2) Zmiany ekspresji mRNA TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 w odleżynach po 2 i 4 tygodniu leczenia; 3) Rodzaj i siła korelacji pomiędzy zmianami pola powierzchni odleżyn, a ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w obszarze odleżyn; 4) Rodzaj i siła korelacji pomiędzy zmianą pola powierzchni odleżyn, a ekspresją mRNA TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 w obszarze odleżyn.

Ad. 1) Celem uzyskania odpowiedzi na pytanie czy 2 i 4-tygodniowe leczenie odleżyn zastosowane w poszczególnych grupach przyczyniło się do zmiany ekspresji mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 we wszystkich grupach porównano RE mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 względem mRNA ACTB po 2 i 4 tygodniach leczenia w stosunku do stanu sprzed leczenia. Celem odpowiedzi na pytanie czy i w jakim stopniu anodowa i katodowa EWN (włączone do leczenia podstawowego) przyczyniły się do zmiany ekspresji genów metaloproteinaz w odleżynach pomiędzy grupami porównano RE mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 względem mRNA ACTB po 2 i 4 tygodniach leczenia.

Ad. 2) Celem uzyskania odpowiedzi na pytanie czy 2 i 4-tygodniowe leczenie odleżyn zastosowane w poszczególnych grupach przyczyniło się do zmiany ekspresji mRNA TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 we wszystkich grupach porównano RE mRNA TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 względem mRNA ACTB po 2 i 4 tygodniach leczenia w stosunku do stanu sprzed leczenia. Celem odpowiedzi na pytanie czy i w jakim stopniu anodowa i katodowa EWN (włączone do leczenia podstawowego) przyczyniły się do zmiany ekspresji mRNA TGF- β w odleżynach pomiędzy grupami porównano RE mRNA TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 względem mRNA ACTB po 2 i 4 tygodniach leczenia.

Ad. 3) Celem uzyskania odpowiedzi czy i w jaki sposób zmiany pola powierzchni odleżyn korelują z ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w poszczególnych grupach zbadano korelacje pomiędzy zmianami pola powierzchni odleżyn a RE mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 względem mRNA ACTB przed rozpoczęciem terapii oraz po 1, 2 i 3 tygodniu terapii.

Ad. 4) Celem uzyskania odpowiedzi czy i w jaki zmiany pola powierzchni odleżyn korelują z ekspresją mRNA TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 w poszczególnych grupach zbadano korelacje pomiędzy zmianami pola powierzchni odleżyn a RE mRNA TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 względem mRNA ACTB przed rozpoczęciem terapii oraz po 1, 2 i 3 tygodniu terapii.

3.11. Wskaźniki zastosowane do oceny zmian pola powierzchni odleżyn

W celu oceny klinicznych efektów gojenia się odleżyn obliczono procentowe wskaźniki zmian pola powierzchni odleżyn po 1, 2, 3 i 4 tygodniu leczenia w stosunku do stanu sprzed leczenia (odpowiednio %PPO1, %PPO2, %PPO3 i %PPO4 według wzorów zamieszczonych w tabeli 2.

Tabela 2. Wskaźniki wykorzystane do oceny zmiany pola powierzchni odleżyn.

Wskaźnik	Wyjaśnienie symboli
%PPO1 - procentowa zmiana PPO po 1 tygodniu leczenia w stosunku do stanu sprzed leczenia [%]	
$\%PPO1 = (PPO0 - PPO1) \times 100\% / PPO0$	PPO0 – PPO przed leczeniem [cm ²] PPO1 – PPO po 1 tygodniu leczenia [cm ²]
%PPO2 - procentowa zmiana PPO po 2 tygodniu leczenia w stosunku do stanu sprzed leczenia [%]	
$\%PPO2 = (PPO0 - PPO2) \times 100\% / PPO0$	PPO0 – PPO przed leczeniem [cm ²] PPO2 – PPO po 2 tygodniach leczenia [cm ²]
%PPO3 - procentowa zmiana PPO po 3 tygodniu leczenia w stosunku do stanu sprzed leczenia [%]	
$\%PPO3 = (PPO0 - PPO3) \times 100\% / PPO0$	PPO0 – PPO przed leczeniem [cm ²] PPO3 – PPO po 3 tygodniach leczenia [cm ²]
%PPO4 - procentowa zmiana PPO po 4 tygodniu leczenia w stosunku do stanu sprzed leczenia [%]	
$\%PPO4 = (PPO0 - PPO4) \times 100\% / PPO0$	PPO0 – PPO przed leczeniem [cm ²] PPO4 – PPO po 4 tygodniach leczenia [cm ²]

Legenda: PPO – pole powierzchni odleżyn.

3.12. Analiza statystyczna

Liczebność pacjentów w grupach: W celu określenia liczby pacjentów w poszczególnych grupach umożliwiającej uzyskanie efektów znamienych statystycznie przeprowadzono badanie pilotażowe, którym objęto 18 chorych z odleżynami II-IV stopnia. Pacjentów podzielono losowo do 3 grup: GEA, GEK i GK. Wszystkich chorych leczono zgodnie z rekomendacjami klinicznymi, a dodatkowo w pilotowych grupach eksperymentalnej zastosowano odpowiednio anodową (GEA) i katodową EWN (GEK), natomiast w pilotowej GK aplikowano symulowaną EWN. Po 4 tygodniach leczenia pomiędzy grupami porównano zmiany procentowe pola powierzchni odleżyn w stosunku do stanu sprzed leczenia. Rozkład

wyników w losowo pobranej próbie był jednomodalny, a skośność i płaskość były mniejsze niż 2,5 dlatego dla oceny wartości centralnej i miary rozproszenia zastosowano średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Założono błąd I rodzaju $\alpha = 0,05$ i błąd II rodzaju $\beta = 0,1$ (moc testu $1-\beta = 0,90$). Dla oceny postępów leczenia w każdej grupie dla badanych cech założono minimalną merytoryczną znamioną różnicę wynoszącą 25% wartości początkowej. Liczebność oszacowano dla pola powierzchni odleżyn wykorzystując rozkład t-Studenta. Przy tych założeniach otrzymano minimalną liczebność grup wynoszącą po 20 pacjentów w każdej grupie (GEA, GEK i GK).

Analiza statystyczna: Do analizy statystycznej wykorzystano program Statistica (wersja 13.1, StatSoft Polska Sp. z o.o.). We wszystkich testach istotność statystyczną przyjęto na poziomie $p \leq 0,05$.

Do badania rozkładu zmiennych charakteryzujących pacjentki zastosowano test W Shapiro – Wilka, natomiast jednorodność wariancji zbadano testem Levena. Ze względu na brak normalności rozkładu zmiennych i brak jednorodności wariancji analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy testów nieparametrycznych. W związku z tym, że skośność i kurtoza wynosiły $< 2,5$, a rozkłady zmiennych były jednomodalne w analizie wyników, oprócz mediany i kwartyli, podano również średnie i odchylenia standardowe odpowiednio jako miary położenia i rozproszenia.

Zmienne cechujące pacjentów przed leczeniem porównano pomiędzy grupami za pomocą testu χ^2 największej wiarygodności oraz testu ANOVA rang Kruskala Wallisa.

Zmiany pola powierzchni odleżyn oraz zmiany ekspresji mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-9, TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 w poszczególnych grupach oceniono za pomocą testu ANOVA rang Friedmana oraz testu post-hoc ANOVA rang Friedmana.

W celu porównania procentowych zmian pola powierzchni odleżyn oraz ekspresji mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-9, TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 pomiędzy grupami wykorzystano test ANOVA rang Kruskala Wallisa oraz test post-hoc ANOVA rang Kruskala Wallisa.

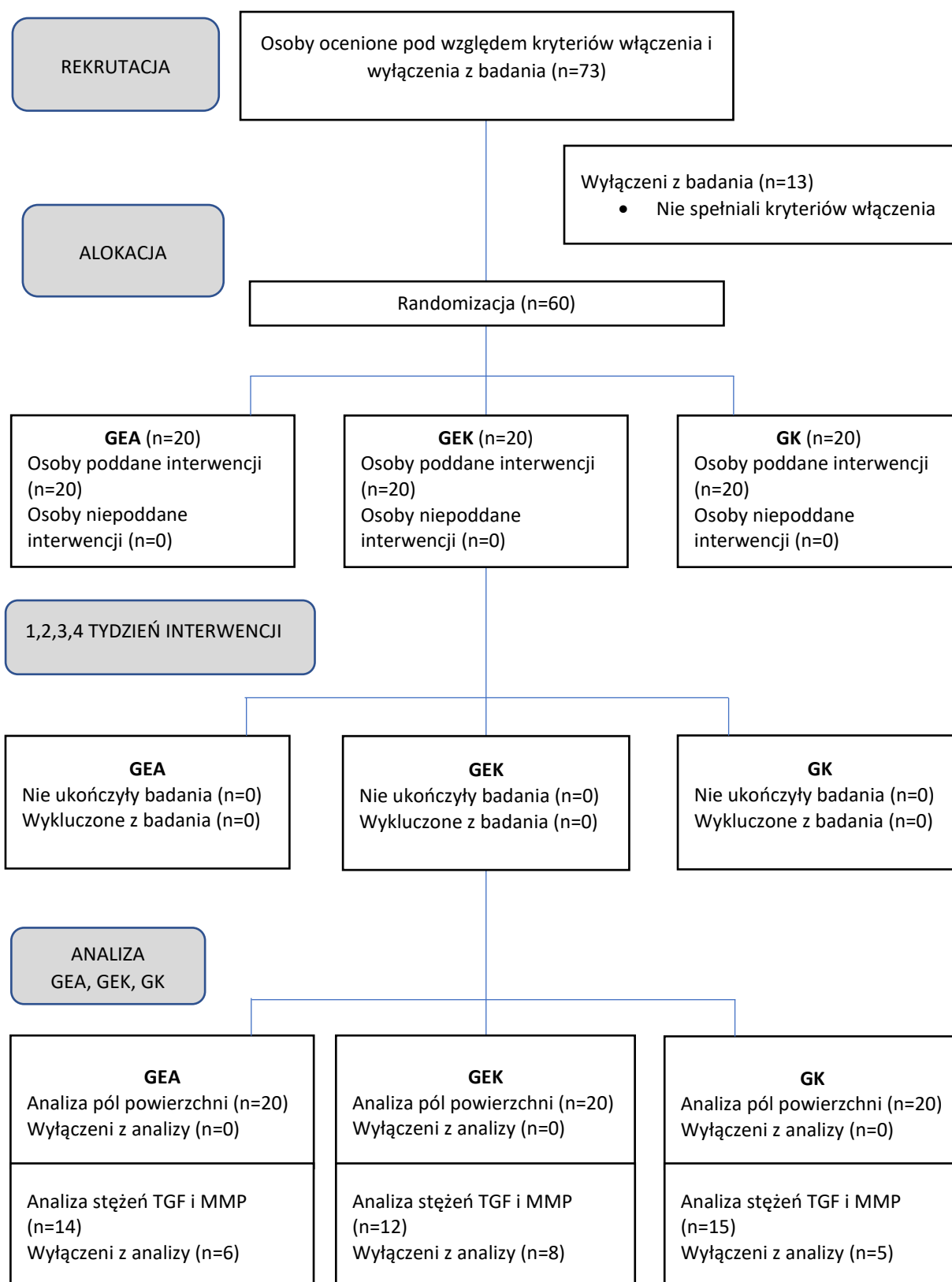
Korelacje pomiędzy ekspresją mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-9, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, a zmianami pola powierzchni odleżyn zbadane zostały za pomocą korelacji rang Spearmana.

4. WYNIKI

W okresie od 1 grudnia 2015 r do 30 stycznia 2017 r. do badania zgłosiły się 73 osoby, spośród których 13 osób nie spełniło kryteriów włączenia do badania. Pozostałe 60 osób włączono do badania i losowo, po 20 osób, podzielono do GEA, GEK i GK. Wszystkie te osoby (100%) były leczone przez 4 tygodnie i u wszystkich osób co tydzień mierzono pole powierzchni odleżyn. Wśród tych 60 osób włączonych do badania, 41 osób (14 osób w GEA, 12 w GEK i 15 w GK) wyraziło zgodę na pobieranie skrawków tkanek z odleżyn celem oznaczenia ekspresji mRNA MMP i TGF- β . Schemat badania został przedstawiony na rycinie 5.

4.1. Charakterystyka badanych i ocena jednorodności grup przed badaniem

W badaniu uczestniczyło 60 osób, w tym 28 (46,7%) kobiet i 32 (53,3%) mężczyzn, w wieku od 22 do 78 lat. Masa ciała 27 osób (45%) mieściła się w normie (Body Mass Index (BMI) 18,5-24,99 kg/m²). U 9 (15%) osób występowała niedowaga (BMI 17,0-18,49 kg/m²). U pozostałych 17 osób masa ciała przewyższała normę, w tym u 14 (23,3%) osób stwierdzono nadwagę (BMI 25,0-29,99 kg/m²), a u 3 (5%) osób na otyłość I stopnia (BMI 30,0-34,99 kg/m²). Większość badanych (n=31; 51,7%) przebyła udar niedokrwienny mózgu. Dwadzieścia sześć (43,3%) osób doznało urazu rdzenia kręgowego, natomiast u pozostałych 3 (5%) badanych wystąpił uraz głowy. Porażenie cztero- lub trzykończynowe występowało u 20 osób (33,3%). Paraplegia występowała u 19 osób (31,7%), a hemiplegia u 20 osób (33,3%). U 46 osób (76,7%) wysoki stopień niepełnosprawności i osoby te wymagały pomocy przy zmianach pozycji ciała w łóżku. U większości badanych (n=35; 58,3%) występowały zaburzenia odżywienia i zastosowano u nich wspomaganie żywieniowe. U 34 osób (56,7%) stwierdzono leukocytozę i wdrożono u nich antybiotykoterapię. U 25 osób (41,7%) występowała anemia. Dwadzieścia osób (33,3%) było leczonych z powodu cukrzycy cukrzycę II stopnia (poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1C) u tych osób nie przekraczał 7%). Dwadzieścia jeden osób (35%) paliło nałogowo papierosy. Ryzyko wystąpienia odleżyn u badanych, oceniane w skali Waterlow kształtowało się na poziomie od 15 do 46 punktów. U 39 osób (65%) występowało więcej niż jedna odleżyna. Wszystkie odleżyny były leczone zgodnie z zasadami najlepszych praktyk klinicznych, ale ES aktywną w grupach eksperymentalnych lub ES symulowaną w GK zastosowano tylko na największej odleżynie. Czas trwania odleżyn, na których przeprowadzano badanie od 4 do 48 tygodni.



Rycina 5. Przebieg badania (zgodnie z wytycznymi CONSORT). GEA – grupa eksperymentalna, w której stosowano elektrostymulację anodową; GEK – grupa eksperymentalna, w której stosowano elektrostymulację katodową; GK – grupa kontrolna; MMP – metaloproteinaza; TGF- β – transformujący czynnik wzrostu; n – liczba.

U 8 badanych (13,3%) występowały odleżyny II stopnia, u 38 badanych (63,3%) stwierdzono odleżyny III stopnia, a 14 badanych (23,3%) cierpiało na odleżyny IV stopnia. U większości osób (n=42; 70%) odleżyny były zlokalizowane na kości krzyżowej. U 8 osób (13,3%) odleżyny występowały na guzie kulszowym lub krętarzu większym kości udowej, natomiast 11 osób (18,3%) cierpiało na umiejscowione na podudziu lub stopie.

Przed interwencją wielkość pola powierzchni odleżyn mieściła się w zakresie od 1,01 do 59,57 cm², w tym w GEA pole powierzchni odleżyn wynosiło średnio 17,876 cm² (SD 10,685 cm²), w GEK – 17,336 cm² (SD 11,690 cm²) i w GK – 24,585 cm² (SD 21,665 cm²).

Relatywna ekspresja mRNA MMP-1 przed interwencją wynosiła średnio w GEA - 0,148 (SD 0,118), w GEK – 0,219 (SD 0,092) i w GK – 0,333 (SD 0,092). W przypadku mRNA MMP-2 wartości te kształtowały się na poziomie - 0,769 (SD 0,410) w GEA, 0,342 (SD 0,084) w GEK i 0,363 (SD 0,329) w GK, a w przypadku mRNA MMP-9 wartości te wynosiły odpowiednio: 0,331 (SD 0,088) w GA, 0,091 (SD 0,052) w GEK i 0,090 (SD 0,044) w GK.

Relatywna ekspresja mRNA TGF-β1 przed interwencją w GEA wynosiła średnio 0,176 (SD 0,093), w GEK - 0,445 (SD 0,428), a w GK - 0,475 (SD 0,427). W przypadku mRNA TGF-β2 wartości te w poszczególnych grupach wynosiły średnio 0,004 (SD 0,003) w GEA, 0,005 (SD 0,001) w GEK i 0,012 (SD 0,002) w GK, a w przypadku mRNA TGF-β3 RE przed interwencją wynosiła odpowiednio: 0,063 (SD 0,047) w GEA, 0,175 (SD 0,132) w GEK i 0,276 (SD 0,317) w GK.

Grupy nie różniły się znamienne statystycznie pod względem większości zmiennych charakteryzujących chorych przed leczeniem ($p > 0,05$). Jedynym wyjątkiem była RE mRNA TGF-β3, w przypadku której wyniki testu ANOVA Kruskala Wallisa wskazywały różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupami ($p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0020$), a analiza post hoc Kruskala Wallisa rozstrzygnęła, że RE mRNA TGF-β3 przed interwencją była w GEA oraz w GEK znamienne statystycznie mniejsza niż w GK ($p(\text{GEA:GK}) = 0,0013$; $p(\text{GEK:GK}) = 0,0397$). Natomiast pomiędzy GEA i GEK przed interwencją nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy RE mRNA TGF-β3 ($p(\text{GEA:GEK}) = 0,194$). Szczegółowe dane dotyczące charakterystyki grup przed leczeniem przedstawiono w tabelach 3 i 4.

Tabela 3. Wyniki oceny jednorodności grup przed leczeniem (liczba pacjentów = 60).

Zmienne	GEA (ES anodowa; n = 20)	GEK (ES katodowa; n = 20)	GK (grupa kontrolna; n = 20)
*Płeć [liczba osób (%): Kobiety / Mężczyźni]	7 (35) / 13 (65)	12 (60) / 8 (40)	9 (45) / 11 (55)
†Wiek [lata]: Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	53,2 / 53,5 / 46,75 – 60,75	54,7 / 55,0 / 49,75 – 67,75	52,55 / 53,0 / 49,0 – 60,75
*BMI [liczba osób (%):			
Niedowaga (17,0–18,49 kg/m ²)	4 (20)	2 (13,3)	3 (16,7)
Masa ciała prawidłowa (18,5–24,99 kg/m ²)	11 (55)	6 (40)	10 (55,6)
Nadwaga (25,0–29,99 kg/m ²)	3 (15)	7 (46,7)	4 (22,2)
Otyłość I stopnia (30,0–34,99 kg/m ²)	2 (10)	0 (0)	1 (3,7)
² Ryzyko odleżyn w skali Waterlow scale [punkty]			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	31,3 / 30,0 / 27,0 – 36,5	29,1 / 29,5 / 25,0 – 33,25	31,8 / 32,5 / 25,0 – 37,25
*Zaburzenia odżywienia [liczba osób (%)]	11 (55)	11 (55)	13 (65)
*Cukrzyca (HbA1C < 7%) [liczba osób (%)]	5 (25)	8 (40)	7 (35)
*Leukocytoza liczba osób (%)	13 (65)	9 (45)	12 (60)
*Etiologia schorzenia neurologicznego:			
Uszkodzenie rdzenia kręgowego [liczba osób (%):	9 (45)	8 (40)	9 (45)
Udar niedokrwienny mózgu [liczba osób (%):	10 (50)	11 (55)	10 (50)
Uraz głowy [liczba osób (%):	1 (5)	1 (5)	1 (5)
*Tetra lub kwadriplegia [liczba osób (%)]	6 (30)	5 (25)	9 (45)
*Paraplegia [liczba osób (%)]	7 (35)	7 (35)	5 (25)
*Hemiplegia [liczba osób (%)]	6 (30)	8 (40)	6 (30)
*Liczba osób z wieloma odleżynami [liczba osób (%)]	12 (60)	12 (60)	15 (75)
*Liczba osób leżących [liczba osób (%)]	5 (25)	2 (10)	7 (35)
*Liczba osób palących papierosy [liczba osób (%)]	8 (40)	5 (25)	8 (40)
†Czas trwania odleżyn [tygodnie]:			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	13,9 / 9 / 8 - 13	12,1 / 8 / 8 - 13	10,55 / 7,5 / 6 - 12
*Lokalizacja odleżyn [liczba osób (%):			
Kość krzyżowa;	14 (70)	15 (75)	13 (65)
Guz kulszowy lub krętarz większy kości udowej	3 (10)	3 (15)	2 (10)
Podudzie lub stopa	4 (20)	2 (10)	5 (25)

Legenda: N – liczba (ang. number); p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; BMI – wskaźnik masy ciała; NPUAP – National Pressure Ulcer Advisory Panel; *Test Chi²; †Test ANOVA Kruskalla-Wallisa; We wszystkich testach różnice zmiennych pomiędzy grupami były nieistotne statystycznie (p(GEA:GEK:GK) > 0,05).

Tabela 4. Wyniki oceny jednorodności grup przed leczeniem (liczba pacjentów = 60), c.d.

Zmienne	GEA (ES anodowa; n = 20)	GEK (ES katodowa; (n = 20)	GK (grupa kontrolna; n = 20)
*Zaawansowanie odleżyn wg skali NPUAP [liczba osób (%)]			
Stopień 2; Stopień 3; Stopień 4	2 (10); 13 (65); 5 (25)	3 (15); 12 (60); 5 (25)	3 (15); 13 (65); 4 (20)
†Pole powierzchni odleżyn [cm ²]			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	17,876 / 10,685 / 4,758 – 22,085	17,336 / 11,69 / 4,565 – 25,533	24,585 / 21,665 / 7,633 – 42,383
†RE mRNA MMP-1 / mRNA ACTB			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	0,148 / 0,118 / 0,052 – 0,192	0,219 / 0,092 / 0,036 – 0,207	0,333 / 0,092 / 0,022 – 0,569
†RE mRNA MMP-2 / mRNA ACTB			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	0,769 / 0,41 / 0,118 – 0,705	0,342 / 0,084 / 0,055 – 0,366	0,363 / 0,329 / 0,221 – 0,528
†RE mRNA MMP-9 / mRNA ACTB			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	0,331 / 0,088 / 0,041 – 0,426	0,091 / 0,052 / 0,029 – 0,139	0,09 / 0,044 / 0,028 – 0,141
†RE mRNA TGF-β1 / mRNA ACTB			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	0,176 / 0,093 / 0,024 – 0,276	0,445 / 0,428 / 0,144 – 0,561	0,475 / 0,427 / 0,049 – 0,685
†RE mRNA TGF-β2 / mRNA ACTB			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	0,004 / 0,003 / 0,001 – 0,004	0,005 / 0,001 / 0,000 – 0,008	0,012 / 0,002 / 0,000 – 0,018
†RE mRNA TGF-β3 / mRNA ACTB			
Średnia (SD) / Mediana / Kwartył dolny – górny	0,063 / 0,047 / 0,025 – 0,087^{IS}	0,175 / 0,132 / 0,055 – 0,288^{IS}	0,276 / 0,317 / 0,125 – 0,392^{IS}

Legenda: N – liczba (ang. number); p – poziom istotności; SD – odchylenie standardowe; RE – relatywna ekspresja; mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. messenger RNA); MMP – metaloproteinaza; TGF – transformujący czynnik wzrostu; *Test Chi²; †Test ANOVA Kruskalla-Wallis; ††Test ANOVA Kruskalla-Wallis + test post hoc Kruskalla Wallisa; We wszystkich testach różnice zmiennych pomiędzy grupami były nieistotne statystycznie (p(GEA:GEK:GK) > 0,05), z wyjątkiem RE mRNA TGF-β3, w przypadku której w GEA i GEK wynik był istotnie statystycznie^{IS} wyższy w stosunku do GK (Test ANOVA Kruskalla Wallisa: p(GEA:GEK:GK) = 0,0020; test post hoc Kruskalla Wallisa: p(GEA:GK) = 0,0013, p(GEK:GK) = 0,0397, p(GEA:GEK) = 0,1940)

4.2. Główne efekty końcowe

4.2.1. Zmiany pola powierzchni odleżyn w poszczególnych tygodniach leczenia

W GEA pole powierzchni odleżyn przed leczeniem wynosiło średnio 17,88 cm² (SD 18,68 cm²). W ciągu kolejnym 4 tygodni terapii zmniejszało się stopniowo i po pierwszym, drugim, trzecim i czwartym tygodniu leczenia wynosiło odpowiednio: 15,69 cm² (SD 17,07 cm²), 13,32 cm² (SD 14,73 cm²), 12,14 cm² (SD 14,32 cm²) i 11,20 cm² (SD 14,35 cm²). Już po drugim tygodniu terapii, jak również po 3 i 4 tygodniu leczenia, w GEA pole powierzchni odleżyn było znamienne statystycznie mniejsze niż przed leczeniem ($p = 0,01$).

W GEK, przed leczeniem pole powierzchni odleżyn wynosiło średnio 17,34 cm² (SD 14,80 cm²). W trakcie terapii zmniejszało się stopniowo i po pierwszym, drugim, trzecim i czwartym tygodniu leczenia wynosiło odpowiednio: 15,28 cm² (SD 13,61 cm²), 13,19 cm² (SD 13,04 cm²), 10,93 cm² (SD 11,87 cm²) i 9,42 cm² (SD 11,06 cm²). I podobnie jak w GEA, już po drugim tygodniu leczenia, a następnie po 3 i 4 tygodniu terapii pole powierzchni odleżyn w GEK było znamienne statystycznie mniejsze niż przed leczeniem ($p = 0,01$).

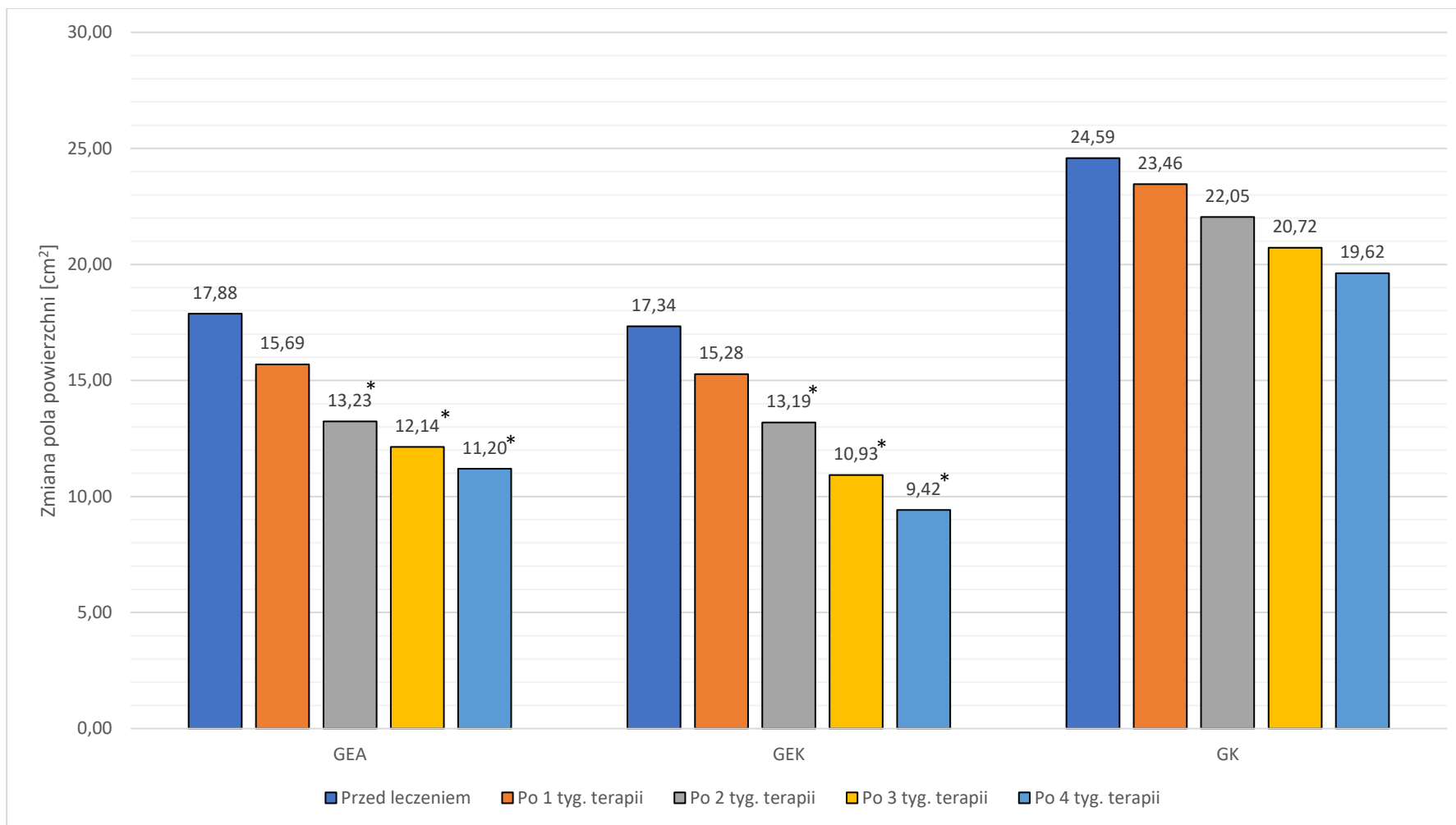
W GK pole powierzchni odleżyn przed leczeniem wynosiło średnio 24,59 cm² (SD 17,90 cm²). W ciągu kolejnym 4 tygodni terapii również zmniejszało się stopniowo, wynosząc po pierwszym, drugim, trzecim i czwartym tygodniu odpowiednio: 23,46 cm² (SD 17,62 cm²), 22,05 cm² (SD 17,28 cm²), 20,72 cm² (SD 16,48 cm²) i 19,62 cm² (SD 16,04 cm²). Niemniej jednak różnice zmian pola powierzchni odleżyn w GK po żadnym z 4 tygodni leczenia nie były znamienne statystycznie mniejsze niż przed leczeniem ($p > 0,05$).

Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 5. Dodatkowo zmiany pola powierzchni odleżyn w poszczególnych grupach zobrazowano na rycinie 6.

Tabela 5. Zmiany pola powierzchni odleżyn w poszczególnych tygodniach terapii w obrębie grup (n = 60).

	Punkt czasowy	GEA	GEK	GK
		Średnia ± SD Mediana (kwartył dolny – kwartył górny)		
Pole powierzchni odleżyn (cm ²)	0	17,88 ± 18,68 10,69 (4,76 – 22,09)	17,34 ± 14,80 11,69 (4,57 – 25,53)	24,59 ± 17,90 21,67 (7,63 – 42,38)
	1	15,69 ± 17,072 8,79 (3,97 – 19,76)	15,28 ± 13,61 11,31 (3,17 – 22,03)	23,46 ± 17,62 19,92 (6,36 – 40,39)
^A Poziom istotności:		<i>p(0:1) > 0,05</i>	<i>p(0:1) > 0,05</i>	<i>p(0:1) > 0,05</i>
Pole powierzchni odleżyn (cm ²)	2	13,23 ± 14,73 6,85 (3,43 – 15,35)	13,19 ± 13,04 9,19 (2,26 – 17,63)	22,05 ± 17,28 17,42 (5,93 – 36,95)
		<i>p(0:2) = 0,01</i>	<i>p(0:2) = 0,01</i>	<i>p(0:2) > 0,05</i>
Pole powierzchni odleżyn (cm ²)	3	12,14 ± 14,32 5,20 (2,53 – 14,63)	10,93 ± 11,87 8,09 (1,840 – 13,40)	20,72 ± 16,48 17,18 (4,78 – 35,83)
		<i>p(0:3) = 0,01</i>	<i>p(0:3) = 0,01</i>	<i>p(0:3) > 0,05</i>
Pole powierzchni odleżyn (cm ²)	4	11,20 ± 14,35 4,62 (1,91 – 13,04)	9,42 ± 11,06 5,92 (1,46 – 11,97)	19,62 ± 16,04 16,53 (4,17 – 32,02)
		<i>p(0:4) = 0,01</i>	<i>p(0:4) = 0,01</i>	<i>p(0:4) > 0,05</i>

Legenda: A - test ANOVA Friedmana; punkty czasowe: 0 – przed terapią; 1 – po 1 tygodniu terapii; 2 – po 2 tygodniach terapii; 3 – po 3 tygodniach terapii; 4 – po 4 tygodniach terapii; SD – odchylenie standardowe; GEA - grupa ES anodowej; GEK - grupa ES katodowej; GK – grupa kontrolna.



Rycina 6. Zmiany pola powierzchni [cm²] odleżyn w poszczególnych grupach (GEA – grupa, w której stosowano elektrostymulację anodową, GEK - grupa, w której stosowano elektrostymulację katodową, GK - grupa kontrolna; *różnica istotna statystycznie w stosunku do stanu początkowego (p = 0,01; test ANOVA Friedmana).

Porównanie zmian pola powierzchni odleżyn pomiędzy grupami

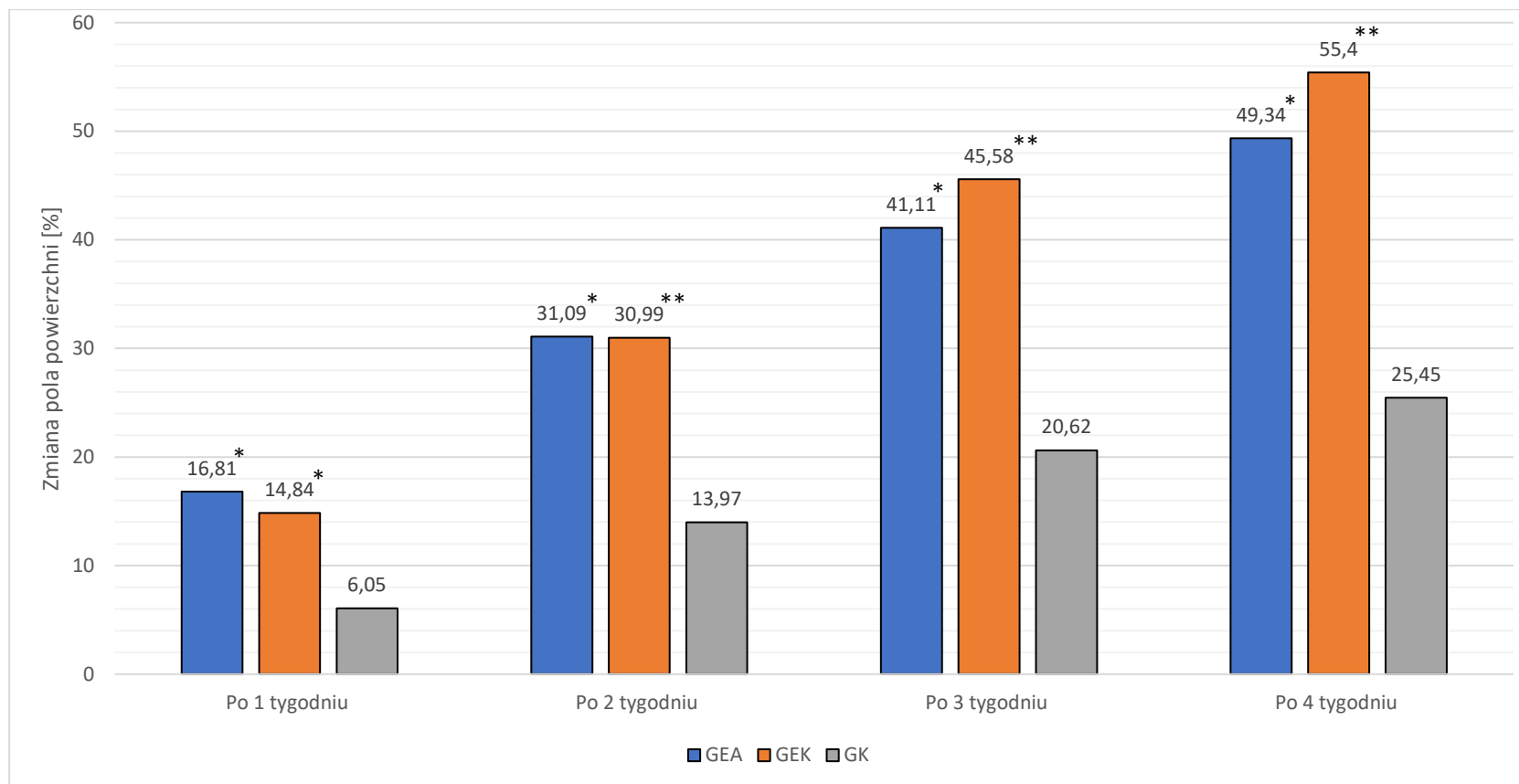
Po 1, 2, 3 i 4 tygodniu leczenia pole powierzchni odleżyn w GEA zmniejszyło się średnio o 16,81% (SD 14,17%), 31,09% (SD 21,59%), 41,11% (SD 27,50%) i 49,34% (SD 30,96%) w stosunku do stanu sprzed leczenia. W GEK pole powierzchni odleżyn zmniejszyło się odpowiednio o 14,84% (SD 9,13%), 30,99% (SD 16,91%), 45,58% (SD 19,29%) i o 55,40% (SD 22,15%), a w GK odpowiednio o 6,05% (SD 6,46%), 13,97% (SD 12,15%), 20,62% (SD 16,60%) i 25,45% (SD 22,88%).

Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami eksperymentalnymi a GK wystąpiły już po 1 tygodniu leczenia ($p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0054$; $p(\text{GEA:GK}) = 0,023$; $p(\text{GEK:GK}) = 0,011$) i utrzymywały się po 2 ($p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0048$; $p(\text{GEA:GK}) = 0,0260$; $p(\text{GEK:GK}) = 0,0082$), 3 ($p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0019$; $p(\text{GEA:GK}) = 0,0414$; $p(\text{GEK:GK}) = 0,0018$) i 4 tygodniu terapii ($p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,001$; $p(\text{GEA:GK}) = 0,028$; $p(\text{GEK:GK}) = 0,001$). W każdym kolejnym tygodniu leczenia zmniejszenie pola powierzchni odleżyn w GEA i GEK było znamienne statystycznie mniejsze niż w GK. W żadnym z punktów końcowych nie wystąpiły różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami eksperymentalnymi. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 6 oraz zobrazowano na rycinie 7.

Tabela 6. Porównanie zmian pola powierzchni odleżyn pomiędzy grupami (n = 60).

Grupa		Procentowa zmiana pola powierzchni odleżyn w stosunku do stanu przed leczeniem [%]			
		Średnia ± SD			
		Mediana (kwartył dolny – kwartył górny)			
		Po 1 tygodniu terapii	Po 2 tygodniach terapii	Po 3 tygodniach terapii	Po 4 tygodniach terapii
GEA	n = 20	16,81 ± 14,17	31,09 ± 21,59	41,11 ± 27,50	49,34 ± 30,96
		15,24 (6,80 – 23,64)	31,70 (14,38 – 46,55)	41,44 (17,61 – 61,73)	48,15 (22,76 – 68,84)
GEK	n = 20	14,84 ± 9,13	30,99 ± 16,91	45,58 ± 19,29	55,40 ± 22,15
		17,63 (8,14 – 19,81)	35,99 (16,26 – 41,02)	47,04 (32,59 – 41,02)	58,61 (42,94 – 70,60)
GK	n = 20	6,05 ± 6,46	13,97 ± 12,15	20,62 ± 16,60	25,45 ± 22,88
		6,35 (1,24 – 9,52)	15,40 (3,96 – 21,50)	18,64 (13,15 – 21,50)	21,03 (12,51 – 31,39)
Poziom istotności		p(GEA;GEK;GK) = 0,005 ^A p(GEA;GK) = 0,023 ^B p(GEK; GK) = 0,011 ^B p(GEA; GEK) = 0,9999	p(GEA;GEK;GK) = 0,0048 ^A p(GEA;GK) = 0,0260 ^B p(GEK; GK) = 0,0082 ^B p(GEA; GEK) = 0,9999	p(GEA;GEK;GK) = 0,0019 ^A p(GEA;GK) = 0,0414 ^B p(GEK; GK) = 0,0018 ^B p(GEA; GEK) = 0,9980	p(GEA;GEK;GK) = 0,001 ^A p(GEA;GK) = 0,0281 ^B p(GEK; GK) = 0,0010 ^B p(GEA; GEK) = 0,9999

Legenda: A – test ANOVA Kruskala Wallisa; B – test post-hoc Kruskala Wallisa; SD – odchylenie standardowe; GEA - grupa ES anodowej; GEK - grupa ES katodowej; GK – grupa kontrolna.



Rycina 7. Procentowa zmiana pola powierzchni odleżyn w stosunku do stanu przed leczeniem w grupach GEA, GEK i grupie kontrolnej [%]; *różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,05$; test post-hoc Kruskala Wallisa); **różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,01$; test post-hoc Kruskala Wallisa).

4.3. Drugorzędne efekty końcowe badania

4.3.1. Relatywna ekspresja mRNA MMP-1,2,9

RE mRNA MMP-1

W GEA RE mRNA MMP-1 przed interwencją wynosiła średnio 0,148 (SD 0,125). Zarówno po 2, jak i po 4 tygodniach interwencji RE mRNA MMP-1 okazała się większa niż przed interwencją i wynosiła odpowiednio 0,780 (SD 1,640) oraz 0,303 (SD 0,478), niemniej jednak różnice pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi (0 – przed interwencją; 2 – po 2 tygodniach interwencji; 4 – po 4 tygodniach interwencji) nie były istotne statystycznie ($p(0:2:4) = 0,6065$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W GEK RE mRNA MMP-1 przed interwencją wynosiła średnio 0,219 (SD 0,309). Po 2 tygodniach interwencji zwiększyła się do 0,375 (SD 0,549), a po 4 tygodniach interwencji zmniejszyła się do 0,255 (SD 0,348), jednak różnice pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi nie były istotne statystycznie ($p(0:2:4) = 0,6675$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W GK RE mRNA MMP-1 przed interwencją wynosiła średnio 0,333 (SD 0,423). Po 2 i 4 tygodniach interwencji RE mRNA MMP-1 zmniejszyła się odpowiednio do 0,290 (SD 0,288) i 0,167 (SD 0,226), ale podobnie jak w grupach eksperymentalnych różnice pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi nie były statystycznie istotne ($p(0:2:4) = 0,0780$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W żadnym z punktów czasowych RE mRNA MMP-1 nie różniła się znamienne statystycznie pomiędzy grupami (przed interwencją $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,9072$; po 2 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,8837$; po 4 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,7740$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

RE mRNA MMP-2

W GEA RE mRNA MMP-2 przed interwencją wynosiła 0,769 (SD 1,145). Zarówno po 2, jak i po 4 tygodniach interwencji RE mRNA MMP-1 zmniejszyła się w stosunku do stanu sprzed interwencji i wynosiła odpowiednio 0,623 (SD 0,532) oraz 0,441 (SD 0,333), ale różnice pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($p(0:2:4) = 0,8071$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W GEK RE mRNA MMP-2 przed interwencją kształtowała się średnio na poziomie 0,342 (SD 0,502). Natomiast po 2 i 4 tygodniach interwencji RE mRNA MMP-2 wynosiła odpowiednio 0,364 (SD 0,512) i 0,480 (SD 0,827). Różnice pomiędzy punktami czasowymi nie były istotne statystycznie ($p(0:2:4) = 0,8616$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W GK RE mRNA MMP-2 przed interwencją wynosiła średnio 0,363 (SD 0,213). Po 2 i 4 tygodniach interwencji RE mRNA MMP-1 zwiększyła się odpowiednio do 0,462 (SD 0,565) i 0,558 (SD 0,902), ale podobnie jak w grupach eksperymentalnych różnice pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi nie były statystycznie istotne ($p(0:2:4) = 0,6918$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W żadnym z punktów czasowych RE mRNA MMP-2 nie różniła się znamienne statystycznie pomiędzy grupami (przed interwencją $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,1816$; po 2 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,1306$; po 4 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,3733$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

RE mRNA MMP-9

W GEA RE mRNA MMP-9 przed interwencją wynosiła średnio 0,331 (SD 0,529). Po 2 tygodniach interwencji RE mRNA MMP-9 zwiększyła się do 0,575 (SD 1,051), a po 4 tygodniach interwencji zmniejszyła się do 0,144 (SD 0,132). Różnice pomiędzy punktami czasowymi nie były istotne statystycznie ($p(0:2:4) = 0,5258$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W GEK RE mRNA MMP-9 przed interwencją kształtowała się średnio na poziomie 0,091 (SD 0,082). Natomiast po 2 i 4 tygodniach interwencji wynosiła odpowiednio 0,178 (SD 0,287) i 0,099 (SD 0,126). Różnice pomiędzy punktami czasowymi nie były istotne statystycznie ($p(0:2:4) = 0,2974$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W GK RE mRNA MMP-9 przed interwencją wynosiła średnio 0,090 (SD 0,097). Po 2 i 4 tygodniach interwencji wynosiła odpowiednio 0,087 (SD 0,087) i 0,148 (SD 0,295). Różnice pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi nie były statystycznie istotne ($p(0:2:4) = 0,4703$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

W żadnym z punktów czasowych RE mRNA MMP-9 nie różniła się znamienne statystycznie pomiędzy grupami (przed interwencją $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,5472$; po 2 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,3979$; po 4 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,1935$). Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Porównanie relatywnej ekspresji mRNA metaloproteinaz przed terapią oraz po 2 i 4 tygodniach terapii w obrębie grup i pomiędzy grupami (n = 41).

Zmienna	Punkt czasowy	Wyniki w obrębie grup						Porównanie wyników pomiędzy grupami
		GEA (n = 14)	p ^A	GEK (n = 12)	p ^A	GK (n = 15)	p ^A	
		Średnia ± SD Mediana (kwartył dolny – kwartył górny)						
RE mRNA MMP-1 [LK]	0	0,148 ± 0,125 0,118 (0,052 – 0,192)	p(0:2:4) = 0,6065	0,219 ± 0,309 0,092 (0,036 – 0,207)	p(0:2:4) = 0,6675	0,333 ± 0,423 0,092 (0,022 – 0,569)	p(0:2:4) = 0,0780	p(GEA;GEK;GK) = 0,9072 ^B
	2	0,780 ± 1,640 0,097 (0,047 – 0,380)		0,375 ± 0,549 0,078 (0,015 – 0,512)		0,290 ± 0,288 0,235 (0,047 – 0,505)		p(GEA;GEK;GK) = 0,8837 ^B
	4	0,303 ± 0,478 0,097 (0,038 – 0,324)		0,255 ± 0,348 0,103 (0,023 – 0,328)		0,167 ± 0,226 0,0916 (0,021 – 0,213)		p(GEA;GEK;GK) = 0,7740 ^B
RE mRNA MMP-2 [LK]	0	0,769 ± 1,145 0,410 (0,118 – 0,705)	p(0:2:4) = 0,8071	0,342 ± 0,502 0,084 (0,055 – 0,366)	p(0:2:4) = 0,8616	0,363 ± 0,213 0,329 (0,221 – 0,528)	p(0:2:4) = 0,6918	p(GEA;GEK;GK) = 0,1816 ^B
	2	0,623 ± 0,532 0,524 (0,125 – 0,939)		0,364 ± 0,512 0,123 (0,032 – 0,463)		0,462 ± 0,565 0,216 (0,076 – 0,667)		p(GEA;GEK;GK) = 0,1306 ^B
	4	0,441 ± 0,333 0,401 (0,135 – 0,673)		0,480 ± 0,827 0,140 (0,052 – 0,387)		0,558 ± 0,902 0,285 (0,051 – 0,536)		p(GEA;GEK;GK) = 0,3733 ^B
RE mRNA MMP-9 [LK]	0	0,331 ± 0,529 0,088 (0,041 – 0,426)	p(0:2:4) = 0,5258	0,091 ± 0,082 0,052 (0,029 – 0,139)	p(0:2:4) = 0,2974	0,090 ± 0,097 0,044 (0,028 – 0,141)	p(0:2:4) = 0,4703	p(GEA;GEK;GK) = 0,5472 ^B
	2	0,575 ± 1,051 0,110 (0,052 – 0,315)		0,178 ± 0,287 0,064 (0,018 – 0,166)		0,087 ± 0,087 0,050 (0,019 – 0,140)		p(GEA;GEK;GK) = 0,3979 ^B
	4	0,144 ± 0,132 0,107 (0,043 – 0,218)		0,099 ± 0,126 0,040 (0,013 – 0,134)		0,148 ± 0,295 0,029 (0,006 – 0,103)		p(GEA;GEK;GK) = 0,1935 ^B

Legenda: RE – relatywna ekspresja; LK – liczba kopii; mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. messenger RNA); MMP – metaloproteinaza; Punkty czasowe: 0 – przed terapią; 2 – po 2 tygodniach terapii; 4 – po 4 tygodniach terapii; ^A – test ANOVA Friedmana; ^B – test ANOVA Kruskalla-Wallis; SD – odchylenie standardowe; GEA - grupa ES anodowej; GEK - grupa ES katodowej; GK – grupa kontrolna.

4.3.2. Relatywna ekspresja mRNA TGF- β 1, 2, 3

RE mRNA TGF- β 1

W GEA RE mRNA TGF- β 1 przed interwencją kształtowała się średnio na poziomie 0,176 (SD 0,203). Po 2 i 4 tygodniach interwencji wynosiła odpowiednio 0,191 (SD 0,239) i 0,186 (SD 0,213). Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy poszczególnymi punktami czasowymi ($p(0:2:4) = 0,2574$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

W GEK RE mRNA TGF- β 1 przed interwencją wynosiła średnio 0,445 (SD 0,349). Po 2 i 4 tygodniach interwencji zwiększyła się odpowiednio do 0,741 (SD 0,919) i 0,675 (SD 0,910), ale różnice pomiędzy punktami czasowymi nie były statystycznie znamienne ($p(0:2:4) = 0,8257$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

W GK RE mRNA TGF- β 1 przed interwencją wynosiła średnio 0,475 (SD 0,477). Po 2 i 4 tygodniach interwencji zmniejszyła się odpowiednio do 0,370 (SD 0,541) i 0,374 (SD 0,428), ale różnice pomiędzy punktami czasowymi nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($p(0:2:4) = 0,5165$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

W żadnym z punktów czasowych RE mRNA TGF- β 1 nie różniła się znamienne statystycznie pomiędzy grupami (przed interwencją $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0653$; po 2 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0653$; po 4 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0798$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

RE mRNA TGF- β 2

W GEA RE mRNA TGF- β 2 przed interwencją wynosiła średnio 0,004 (SD 0,004). Po 2 i 4 tygodniach interwencji zwiększyła się odpowiednio do 0,008 (SD 0,013) i 0,007 (SD 0,011), ale różnice pomiędzy punktami czasowymi nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($p(0:2:4) = 0,8071$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

W GEK RE mRNA TGF- β 2 przed interwencją wynosiła średnio 0,005 (SD 0,007). Po 2 i 4 tygodniach interwencji zwiększyła się odpowiednio do 0,007 (SD 0,011) i 0,008 (SD 0,013), ale różnice pomiędzy punktami czasowymi również nie były istotne statystycznie ($p(0:2:4) = 0,8257$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

W GK RE mRNA TGF- β 2 przed interwencją wynosiła średnio 0,012 (SD 0,016). Po 2 i 4 tygodniach interwencji zmniejszyła się odpowiednio do 0,017 (SD 0,026) i 0,027 (SD 0,053), ale różnice pomiędzy punktami czasowymi, podobnie jak w grupach eksperymentalnych,

nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($p(0:2:4) = 0,3365$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

W żadnym z punktów czasowych RE mRNA TGF- β 2 nie różniła się znamienne statystycznie pomiędzy grupami (przed interwencją $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,7077$; po 2 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,9469$; po 4 tygodniach interwencji $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,6680$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

RE mRNA TGF- β 3

W GEA RE mRNA TGF- β 3 przed interwencją wynosiła średnio 0,063 (SD 0,061). Po 2 i 4 tygodniach interwencji wynosiła odpowiednio 0,076 (SD 0,058) i 0,068 (SD 0,079). Różnice pomiędzy punktami czasowymi nie były istotne statystycznie ($p(0:2:4) = 0,1537$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

W GEK RE mRNA TGF- β 3 przed interwencją wynosiła średnio 0,175 (SD 0,157). Po 2 i 4 tygodniach interwencji zwiększyła się odpowiednio do 0,197 (SD 0,159) i 0,169 (SD 0,131), ale różnice pomiędzy punktami czasowymi nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($p(0:2:4) = 0,6675$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

W GK RE mRNA TGF- β 3 przed interwencją wynosiła średnio 0,276 (SD 0,176). Po 2 i 4 tygodniach interwencji zwiększyła się odpowiednio do 0,304 (SD 0,270) i 0,328 (SD 0,309), ale różnice pomiędzy punktami czasowymi nie były statystycznie istotne ($p(0:2:4) = 0,7928$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

Przed interwencją przy pomocy testu ANOVA Kruskala Wallisa wykryto różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupami w odniesieniu do RE mRNA TGF- β 3 ($p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0020$). Analiza post hoc Kruskala Wallisa wykazała, że przed interwencją RE mRNA TGF- β 3 w GEA oraz w GEK była znamienne statystycznie mniejsza niż w GK ($p(\text{GEA:GK}) = 0,0013$; $p(\text{GEK:GK}) = 0,0397$). Pomędzy grupami eksperymentalnymi przed interwencją RE mRNA TGF- β 3 nie różniła się istotnie statystycznie ($p(\text{GEA:GEK}) = 0,1940$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

Po 2 tygodniach interwencji odnotowano zwiększenie RE mRNA TGF- β 3 w GEK, która w tym okresie nie różniła się już istotnie statystycznie od RE mRNA TGF- β 3 w GK ($p(\text{GEK:GK}) = 0,9130$) i równocześnie okazała się znamienne statystycznie większa niż w GEA ($p(\text{GEA:GEK}) = 0,0453$). W GEA RE mRNA TGF- β 3 po 2 tygodniach interwencji nadal utrzymywała się na poziomie znamienne statystycznie niższym niż w GK ($p(\text{GEA:GK}) = 0,0008$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

Po 4 tygodniach interwencji RE mRNA TGF- β 3 w GEA nadal utrzymywała się na poziomie znamienne statystycznie niższym niż w GK ($p(\text{GEA:GK}) = 0,0165$). Natomiast w GEK RE mRNA TGF- β 3 uległa nieistotnemu statystycznie zmniejszeniu w stosunku do stanu po 2 tygodniach interwencji i nie był już znamienne statystycznie wyższy niż w GEA ($p(\text{GEA:GEK}) = 0,1190$), niemniej jednak nadal utrzymywał się na poziomie porównywalnym do GK ($p(\text{GEK:GK}) = 0,9990$). Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Porównanie relatywnej ekspresji mRNA izoform TGF-β przed terapią oraz po 2 i 4 tygodniach terapii w obrębie grup i pomiędzy grupami (n = 40).

Zmienna	Punkt czasowy	Wyniki w obrębie grup						Porównanie wyników pomiędzy grupami
		GEA (n = 13)	p ^A	GEK (n = 12)	p ^A	GK (n = 15)	p ^A	
		Średnia ± SD Mediana (kwartył dolny – kwartył górny)						
RE mRNA TGF-β1 [LK]	0	0,176 ± 0,203 0,093 (0,024 – 0,274)	p(0:2:4) = 0,2574	0,445 ± 0,349 0,428 (0,144 – 0,561)	p(0:2:4) = 0,8257	0,475 ± 0,477 0,427 (0,049 – 0,685)	p(0:2:4) = 0,5165	p(GEA;GEK;GK) = 0,0653 ^B
	2	0,191 ± 0,239 0,082 (0,035 – 0,266)		0,741 ± 0,919 0,294 (0,081 – 1,108)		0,370 ± 0,541 0,129 (0,085 – 0,548)		p(GEA;GEK;GK) = 0,0653
	4	0,186 ± 0,213 0,104 (0,053 – 0,157)		0,675 ± 0,910 0,340 (0,138 – 0,655)		0,374 ± 0,428 0,309 (0,079 – 0,559)		p(GEA;GEK;GK) = 0,0798 ^B
RE mRNA TGF-β2 [LK]	0	0,004 ± 0,004 0,002 (0,001 – 0,004)	p(0:2:4) = 0,8071	0,005 ± 0,007 0,001 (0,000 – 0,008)	p(0:2:4) = 0,8257	0,012 ± 0,016 0,002 (0,000 – 0,018)	p(0:2:4) = 0,3365	p(GEA;GEK;GK) = 0,7077 ^B
	2	0,008 ± 0,013 0,001 (0,000 – 0,006)		0,007 ± 0,011 0,001 (0,000 – 0,008)		0,017 ± 0,026 0,001 (0,000 – 0,028)		p(GEA;GEK;GK) = 0,9469 ^B
	4	0,007 ± 0,011 0,002 (0,001 – 0,005)		0,008 ± 0,013 0,001 (0,001 – 0,012)		0,027 ± 0,053 0,000 (0,000 – 0,017)		p(GEA;GEK;GK) = 0,6680 ^B
RE mRNA TGF-β3 [LK]	0	0,063 ± 0,061 0,047 (0,025 – 0,087)	p(0:2:4) = 0,1537	0,175 ± 0,157 0,132 (0,055 – 0,288)	p(0:2:4) = 0,6675	0,276 ± 0,176 0,317 (0,125 – 0,392)	p(0:2:4) = 0,7928	p(GEA;GEK;GK) = 0,0020^B p(GEA;GEK) = 0,1940 ^C p(GEA;GK) = 0,0013^C p(GEK;GK) = 0,0397^C
	2	0,076 ± 0,058 0,062 (0,027 – 0,114)		0,197 ± 0,159 0,149 (0,101 – 0,225)		0,304 ± 0,270 0,192 (0,128 – 0,326)		p(GEA;GEK;GK) = 0,0010^B p(GEA;GK) = 0,0453^C p(GEA;GK) = 0,0008^C p(GEK;GK) = 0,9130 ^C
	4	0,068 ± 0,079 0,038 (0,025 – 0,072)		0,169 ± 0,131 0,141 (0,086 – 0,239)		0,328 ± 0,309 0,210 (0,079 – 0,563)		p(GEA;GEK;GK) = 0,0154^B p(GEA;GK) = 0,1190 ^C p(GEA;GK) = 0,0165^C p(GEK;GK) = 0,9990 ^C

Legenda: RE – relatywna ekspresja; LK – liczba kopii; mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. messenger RNA); MMP – metaloproteinaza; 0 – przed terapią; 2T – po 2 tygodniach terapii; 4T – po 4 tygodniach terapii; ^A – test ANOVA Friedmana; ^B – test ANOVA Kruskalla-Wallis; ^C – test post-hoc; SD – odchylenie standardowe; GEA - grupa ES anodowej; GEK - grupa ES katodowej; GK – grupa kontrolna.

4.4. Ocena korelacji pomiędzy RE mRNA MMP i TGF- β , a zmianami pola powierzchni odleżyn

W żadnej z grup nie odnotowano istotnych statystycznie i silnych korelacji pomiędzy RE mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 przed interwencją, po 2 tygodniach interwencji oraz po 4 tygodniach interwencji a procentową zmianą pola powierzchni odleżyn uzyskaną po 4 tygodniach leczenia (%PPO4). Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 9.

W żadnej z grup nie odnotowano również istotnych statystycznie i silnych korelacji pomiędzy RE mRNA TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 przed interwencją, po 2 tygodniach interwencji oraz po 4 tygodniach interwencji, a procentową zmianą pola powierzchni odleżyn uzyskaną po 4 tygodniach leczenia (%PPO4). Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 9. Wyniki badania korelacji pomiędzy RE mRNA MMP-1,2,9 przed interwencją oraz po 2 i 4 tygodniach interwencji, a procentową zmianą pola powierzchni odleżyn (Liczba pacjentów = 41).

Grupa	Zmienna	Liczba pacjentów	Współczynnik korelacji	Poziom istotności ¹
GEA	0 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	14	R= -0,332	p= 0,246
	2 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	14	R= -0,136	p= 0,642
	4 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	14	R= -0,015	p= 0,958
	0 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	14	R= -0,059	p= 0,840
	2 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	14	R= -0,396	p= 0,161
	4 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	14	R= 0,031	p= 0,917
	0 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	14	R= 0,147	p= 0,615
	2 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	14	R= -0,048	p= 0,869
	4 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	14	R= -0,176	p= 0,547
GEK	0 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	12	R= -0,364	p= 0,245
	2 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	12	R= -0,042	p= 0,897
	4 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	12	R= 0,000	p= 1,000
	0 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	12	R= -0,231	p= 0,471
	2 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	12	R= 0,231	p= 0,471
	4 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	12	R= 0,371	p= 0,236
	0 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	12	R= 0,021	p= 0,948
	2 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	12	R= 0,154	p= 0,633
	4 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	12	R= 0,042	p= 0,897
GK	0 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	15	R= -0,100	p= 0,723
	2 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	15	R= -0,364	p= 0,182
	4 RE mRNA MMP-1 : %PPO4	15	R= -0,336	p= 0,221
	0 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	15	R= -0,282	p= 0,308
	2 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	15	R= -0,529	p= 0,053
	4 RE mRNA MMP-2 : %PPO4	15	R= -0,368	p= 0,177
	0 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	15	R= -0,446	p= 0,095
	2 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	15	R= -0,450	p= 0,092
	4 RE mRNA MMP-9 : %PPO4	15	R= -0,325	p= 0,237

¹Korelacja rang Spearmana; 0 RE, 2 RE, 4 RE – relatywna ekspresja odpowiednio przed interwencją oraz po 2 i 4 tygodniach interwencji; mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy; MMP – metaloproteinaza; %PPO4 – procentowa zmiana pola powierzchni odleżyn po 4 tygodniach leczenia.

Tabela 10. Wyniki badania korelacji pomiędzy RE mRNA TGF- β 1,2,3 przed interwencją oraz po 2 i 4 tygodniach interwencji, a procentową zmianą pola powierzchni odleżyn (Liczba pacjentów = 40).

Grupa	Zmienna	Liczba pacjentów	Współczynnik korelacji	Poziom istotności ¹
GEA	0 RE mRNA TGF- β 1 : %PPO4	14	R= -0,081	p= -0,081
	2 RE mRNA TGF- β 1 : %PPO4	14	R= -0,436	p= -0,436
	4 RE mRNA TGF- β 1 : %PPO4	14	R= -0,288	p= -0,288
	0 RE mRNA TGF- β 2 : %PPO4	14	R= -0,295	p= -0,295
	2 RE mRNA TGF- β 2 : %PPO4	14	R= 0,040	p= 0,040
	4 RE mRNA TGF- β 2 : %PPO4	14	R= -0,255	p= -0,255
	0 RE mRNA TGF- β 3 : %PPO4	14	R= 0,209	p= 0,209
	2 RE mRNA TGF- β 3 : %PPO4	14	R= -0,392	p= -0,392
GEK	4 RE mRNA TGF- β 3 : %PPO4	14	R= 0,086	p= 0,086
	0 mRNA TGF- β 1 : %PPO4	12	R= -0,371	p= 0,236
	2 mRNA TGF- β 1 : %PPO4	12	R= 0,084	p= 0,795
	4 mRNA TGF- β 1 : %PPO4	12	R= -0,133	p= 0,681
	0 mRNA TGF- β 2 : %PPO4	12	R= 0,203	p= 0,527
	2 mRNA TGF- β 2 : %PPO4	12	R= 0,245	p= 0,443
	4 mRNA TGF- β 2 : %PPO4	12	R= 0,028	p= 0,931
	0 mRNA TGF- β 3 : %PPO4	12	R= -0,049	p= 0,880
GK	2 mRNA TGF- β 3 : %PPO4	12	R= -0,021	p= 0,948
	4 mRNA TGF- β 3 : %PPO4	12	R= -0,147	p= 0,649
	0 mRNA TGF- β 1 : %PPO4	15	R= -0,179	p= 0,524
	2 mRNA TGF- β 1 : %PPO4	15	R= -0,282	p= 0,308
	4 mRNA TGF- β 1 : %PPO4	15	R= -0,175	p= 0,533
	0 mRNA TGF- β 2 : %PPO4	15	R= -0,329	p= 0,232
	2 mRNA TGF- β 2 : %PPO4	15	R= -0,293	p= 0,289
	4 mRNA TGF- β 2 : %PPO4	15	R= -0,396	p= 0,143
GK	0 mRNA TGF- β 3 : %PPO4	15	R= 0,057	p= 0,840
	2 mRNA TGF- β 3 : %PPO4	15	R= 0,193	p= 0,491
	4 mRNA TGF- β 3 : %PPO4	15	R= -0,111	p= 0,694

¹Korelacja rang Spearmana; 0 RE, 2 RE, 4 RE – relatywna ekspresja odpowiednio przed interwencją oraz po 2 i 4 tygodniach interwencji; mRNA – informacyjny kwas rybonukleinowy; TGF- β – transformujący czynnik wzrostu- β ; %PPO4 – procentowa zmiana pola powierzchni odleżyn po 4 tygodniach leczenia.

5. DYSKUSJA

5.1. Omówienie wyników

W badaniu własnym we wszystkich grupach stosowano profilaktykę i leczenie odleżyn zgodnie z zasadami najlepszych praktyk klinicznych, a dodatkowo w poszczególnych grupach eksperymentalnych zastosowano anodową i katodową EWN, natomiast w GK prowadzono symulowaną EWN. Po 4 tygodniach leczenia jedynie w grupach eksperymentalnych odnotowano znamienne statystycznie zmniejszenie pola powierzchni odleżyn. Zauważyć trzeba, że w obu grupach eksperymentalnych już po drugim tygodniu stosowania odpowiednio anodowej i katodowej EWN pole powierzchni odleżyn było znamienne statystycznie mniejsze niż przed interwencją. Zmniejszenie pola powierzchni odleżyn w obu grupach eksperymentalnych było znamienne statystycznie większe niż w GK już po pierwszym tygodniu interwencji. Pomiedzy grupami eksperymentalnymi nie odnotowano istotnych statystycznie różnic zmian pola powierzchni odleżyn. W związku z powyższym uzyskane wyniki potwierdziły założenia badawcze, że 4-tygodniowa anodowa i katodowa EWN, w podobnym stopniu przyczyniają się do zmniejszenia pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia u pacjentów ze schorzeniami centralnego układu nerwowego.

Nie odnotowano istotnie statystycznego wpływu EWN anodowej i katodowej na ekspresję genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9, w związku z czym wyniki nie potwierdziły założenia badawczego, że EWN aplikowana przy użyciu anody lub katody jako elektrod leczniczych przyczyni się do zmniejszenia ekspresji MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w obszarze odleżyn u pacjentów z uszkodzeniami centralnego układu nerwowego.

Nie stwierdzono również znamiennego statystycznie wpływu EWN anodowej i katodowej na ekspresję genów TGF- β 1 i TGF- β 2, w związku z czym wyniki nie potwierdziły założenia badawczego, że EWN wykonywana anodą i katodą jako elektrodami leczniczymi przyczyni się do zwiększenia ekspresji genów TGF- β 1 i TGF- β 2 w obszarze odleżyn u pacjentów z uszkodzeniami centralnego układu nerwowego.

Pod wpływem EWN aplikowanej anodą jako elektrodą leczniczą nie odnotowano istotnych statystycznie zmian ekspresji genów TGF- β 3, a w związku z czym nie można potwierdzić założenia badawczego, że EWN anodowa przyczyni się do zwiększenia ekspresji genów TGF- β 3 w obszarze odleżyn u pacjentów z uszkodzeniami centralnego układu nerwowego. Natomiast pod wpływem EWN katodowej ekspresja genów TGF- β 3 zwiększyła się i po 2 oraz 4 tygodniach leczenia nie różniła się już znamienne statystycznie od wartości uzyskanych w GK. Po 2

tygodniach terapii ekspresja genów TGF- β 3 uzyskana pod wpływem EWN katodowej okazała się z namiennie statystycznie wyższa niż po wpływie EWN anodowej. W związku z powyższym można przyjąć, że wyniki potwierdziły założenie badawcze, iż EWN katodowa przyczyni się do zwiększenia ekspresji genów TGF- β 3 w obszarze odleżyn u pacjentów z uszkodzeniami centralnego układu nerwowego i że ekspresja ta pod wpływem EWN katodowej jest wyższa niż pod wpływem EWN anodowej. Wynik ten należy jednak interpretować z ostrożnością i powinien być on zweryfikowany w dalszych, wysokiej jakości randomizowanych badaniach klinicznych.

W badaniu nie odnotowano także istotnych statystycznie i silnych korelacji pomiędzy ekspresją genów metaloproteinaz (MMP-1, MMP-2, MMP-9), a zmianami pola powierzchni odleżyn. W związku z czym wyniki badania nie potwierdziły założeń badawczych, że w grupach, w których zostanie zastosowana EWN anodowa i katodowa wystąpią silne, istotne statystycznie, ujemne korelacje pomiędzy ekspresją genów MMP-1, 2 i 9, a zmianami pola powierzchni odleżyn u pacjentów z uszkodzeniami centralnego układu nerwowego.

W badaniu nie stwierdzono również istotnych statystycznie i silnych korelacji pomiędzy ekspresją genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3, a zmianami pola powierzchni odleżyn. W związku z czym wyniki badania nie potwierdziły założeń badawczych, że w grupach, w których zostanie zastosowana EWN anodowa i katodowa zwiększenie ekspresji genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 będzie silnie, dodatnio i istotne statystycznie skorelowane z procentowym wskaźnikiem zmniejszenia się pola powierzchni odleżyn u pacjentów z uszkodzeniami centralnego układu nerwowego.

5.2. Odniesienie wyników własnych do badań innych autorów

5.2.1. Główne efekty końcowe badania

Głównym, końcowym efektem klinicznym badania były zmiany pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia uzyskane w trakcie 4-tygodniowej interwencji, obejmującej leczenie odleżyn zgodne z zasadami najlepszych praktyk klinicznych wzbogacone o anodową i katodową EWN. Podobne efekty końcowe były również oceniane w innych randomizowanych badaniach klinicznych,^{186,202,204–206,208,209} w których przy pomocy EWN leczono odleżyny II,^{186,204–206,208,209} III^{186,204–206,208,209} i IV^{186,202,204,205,209} stopnia. W 4 badaniach^{186,202,204,205} odleżyny występowały u osób z uszkodzeniami centralnego układu nerwowego (głównie rdzenia kręgowego), podobnie jak w badaniu własnym. Dwa badania^{208,209} przeprowadzono u osób, u których odleżyny wystąpiły

na tle chorób powstałych z racji zaawansowanego wieku, a w jednym badaniu²⁰⁶ leczono odleżyny powstałe u osób unieruchomionych z przyczyn ortopedycznych.

We wszystkich badaniach^{186,202,204–206,208,209} (podobnie jak w badaniu własnym), ze względów etycznych, zarówno w grupach eksperymentalnych, jak i w grupach kontrolnych stosowano leczenie odleżyn oparte na rekomendacjach klinicznych. W 2 badaniach,^{205,206} w grupach kontrolnych terapia oparta na zaleceniach klinicznych była jedyną formą leczenia odleżyn. W pozostałych 5 badaniach^{186,202,204,208,209} w grupach kontrolnych dodatkowo aplikowano symulowaną EWN, podobnie jak w badaniu własnym.

W grupach eksperymentalnych (oprócz terapii opartej na zaleceniach klinicznych) aplikowano EWN z tym, że badacze stosowali różną polaryzację elektrody leczniczej. Stymulację anodową zastosowano w 2 badaniach.^{186,202} W 3 badaniach^{186,204,208,209} elektrodą leczniczą była katoda. Przeprowadzono również 3 badania,^{205,206,209} w których w trakcie leczenia zmieniano polaryzację elektrody leczniczej, przy czym Houghton i wsp.²⁰⁵ zmieniali polaryzację elektrody leczniczej co tydzień, rozpoczynając leczenie od stymulacji katodowej. Franek i wsp.²⁰⁶ stymulację katodową stosowali przez pierwsze 1-2 tygodnie aż do oczyszczenia odleżyn z wydzieliny ropnej i martwicy rozplywnej, oraz do pobudzenia ziarninowania ran, a następnie do końca terapii (trwającej w sumie 6 tygodni) odleżyny były stymulowane anodą. Polak i wsp.¹⁸⁶ rozpoczynali leczenie od stymulacji katodowej, która trwała 1 tydzień, a przez kolejne 5 tygodni stosowano stymulację anodową. W dwóch badaniach przeprowadzonych przez zespół Polak i wsp.^{186,209} porównano efekty leczenia odleżyn w 2 grupach eksperymentalnych, w których zastosowano różne metody polaryzacji elektrody leczniczej. W pierwszym z tych badań²⁰⁹ porównano gojenie się odleżyn pod wpływem stymulacji katodowej stosowanej przez 6 tygodni do stymulacji, w trakcie której katoda była stosowana przez 1 tydzień, a przez kolejne 5 tygodni aplikowano stymulację anodową. Natomiast w drugim badaniu¹⁸⁶ przez 8 tygodni w jednej grupie eksperymentalnej stosowano wyłącznie EWN anodową, a w drugiej grupie eksperymentalnej aplikowano wyłącznie stymulację katodową.

We wszystkich cytowanych badaniach^{186,202,204–206,208,209} jako główny efekt końcowy przyjęto procentowe zmiany pola powierzchni odleżyn uzyskane w trakcie leczenia, podobnie jak miało to miejsce w badaniu własnym. Tylko w jednym z cytowanych badań, przeprowadzonym przez Kloth i Feedar²⁰² leczenie przy pomocy EWN prowadzono aż do całkowitego zamknięcia się odleżyn (zmniejszenie pola powierzchni odleżyn o 100%). W pozostałych badaniach obserwowano procentowe zmiany pola powierzchni odleżyn po 3,²⁰⁴ 6,^{206,208,209} 8¹⁸⁶ i 12²⁰⁵

tygodniach stosowania EWN w stosunku do stanu początkowego. We wszystkich badaniach,^{186,202,204–206,208,209} podobnie jak w badaniu własnym w grupach eksperymentalnych pole powierzchni odleżyn zmniejszyło się w stopniu znamienne statystycznie większym niż w grupach kontrolnych.

W badaniu własnym pole powierzchni odleżyn poddanych EWN anodowej po 4 tygodniach interwencji zmniejszyło się średnio o 49,34% w stosunku do stanu początkowego, natomiast pod wpływem EWN katodowej po 4 tygodniach interwencji pole powierzchni odleżyn było mniejsze średnio o 55,40% w stosunku do stanu początkowego. W obu grupach eksperymentalnych zmniejszenie pola powierzchni odleżyn było znamienne statystycznie większe niż w GK, w której stosowana była symulowana EWN.

W badaniu przeprowadzonym przez Kloth i Feedar,²⁰² w którym stosowano anodową EWN pole powierzchni 9 odleżyn IV stopnia zmniejszało się średnio o 44,89% na tydzień i całkowite zagojenie się odleżyn następowało średnio w ciągu 7,3 tygodnia. Natomiast w grupie kontrolnej pole powierzchni 8 odleżyn IV stopnia zwiększyło się średnio o 28,8% w ciągu 7,4 tygodnia. W badaniu przeprowadzonym przez Polak i wsp.¹⁸⁶ pod wpływem anodowej EWN stosowanej przez 8 tygodni pole powierzchni 20 odleżyn II-IV stopnia zmniejszyło się średnio o 64,10% co było wynikiem znamienne statystycznie lepszym ($p = 0,0391$) niż w grupie kontrolnej, w której pole powierzchni 20 odleżyn zmniejszyło się średnio o 41,42%.

Griffin i wsp.²⁰⁴ po 20 dniach stosowania katodowej EWN uzyskali zmniejszenie pola powierzchni 8 odleżyn II-IV stopnia średnio o 80% w stosunku do stanu początkowego, co było wynikiem znamienne statystycznie lepszym ($p < 0,05$) niż w GK, w której w tym samym czasie pole powierzchni 9 odleżyn zmniejszyło się średnio o 52% ($p < 0,05$). Polak i wsp.²⁰⁸ po 6 tygodniach stosowania EWN katodowej odnotowali zmniejszenie pola powierzchni odleżyn II-III stopnia średnio o 80,31%, co było wynikiem znamienne statystycznie lepszym ($p=0,046$) niż w GK, w której odleżyny u 24 pacjentów zmniejszyły się średnio o 54,66%. W innym badaniu przeprowadzonym przez Polak i wsp.¹⁸⁶ pod wpływem EWN katodowej stosowanej przez 8 tygodni odleżyny II-IV stopnia zmniejszyły się średnio o 74,06%, co dało wynik znamienne statystycznie lepszy niż w GK (41,42%; $p = 0,0024$). W badaniu Polak i wsp.,¹⁸⁶ procentowe zmniejszenie pola powierzchni odleżyn pod wpływem EWN anodowej i katodowej stosowanych przez 8 tygodni nie różniło się istotnie statystycznie ($p = 0,9999$). W badaniu własnym, po 4 tygodniach leczenia anodowa i katodowa EWN również w podobnym stopniu wpłynęły na zmniejszenie pola powierzchni odleżyn ($p = 0,9999$).

Gojenie się odleżyn jest również skutecznie wspomagane przy pomocy EWN, w trakcie której polaryzacja elektrody leczniczej jest zmieniana. W badaniu przeprowadzonym przez Houghton i wsp.²⁰⁵ po 12 tygodniach stosowania EWN, w trakcie której polaryzacja elektrody leczniczej była zmieniana z katody na anodę co 3 dni, uzyskano zmniejszenie pola powierzchni 14 odleżyn II-IV stopnia średnio o 70%, co dało wynik znamienne statystycznie większy niż w grupie kontrolnej, w której pole powierzchni 13 odleżyn zmniejszyło się o 36% ($p = 0,048$). Zmienną polaryzację elektrody leczniczej z powodzeniem zastosowano także w kolejnym badaniu, w którym leczono odleżyny II-III stopnia u pacjentów unieruchomionych z przyczyn ortopedycznych.²⁰⁶ U 26 osób w grupie eksperymentalnej przez 6 tygodni stosowano EWN, w tym przez pierwsze 1-3 tygodni (w zależności od stopnia ziarninowania ran) aplikowano stymulację katodową, a następnie do końca leczenia stymulację anodową. Po 6 tygodniach terapii pole powierzchni odleżyn w grupie poddanej EWN zmniejszyło się średnio o 88,9% w stosunku do stanu początkowego co dało wynik znamienne statystycznie większy niż w grupie kontrolnej, w której pole powierzchni odleżyn u 24 chorych zmniejszyło się średnio o 44,4% ($p = 0,00003$). W badaniu²⁰⁹ przeprowadzonym u osób w zaawansowanym wieku po 6 tygodniach stosowania EWN katodowej pole powierzchni 23 odleżyn zmniejszyło się średnio o 82,34% w stosunku do stanu początkowego. Efekt ten nie różnił się znamienne statystycznie ($p = 0,9932$) od wyniku uzyskanego w drugiej grupie eksperymentalnej, w której 20 odleżyn było w pierwszym tygodniu stymulowanych katodą a przez kolejnych 5 tygodni anodą i których pole powierzchni zmniejszyło się o 70,77%. Natomiast wyniki uzyskane w obu grupach eksperymentalnych były znamienne statystycznie większe niż w grupie kontrolnej, w której pole powierzchni 20 odleżyn zmniejszyło się o 40,53% w stosunku do stanu początkowego (odpowiednio $p = 0,0006$ i $p = 0,0124$).

W badaniu własnym oceniono również dynamikę zmniejszania się pola powierzchni odleżyn po 1, 2, 3 i 4 tygodniu terapii. Okazało się, że już po 1 tygodniu stosowania anodowej i katodowej EWN w grupach eksperymentalnych zmniejszenie pola powierzchni odleżyn było znamienne statystycznie większe niż w grupie kontrolnej. Po 1 tygodniu leczenia pod wpływem EWN anodowej pole powierzchni odleżyn zmniejszyło się średnio o 16,81%, pod wpływem WEN katodowej o 14,84%, a w GK o 6,05% ($p(\text{GEA:GK}) = 0,023$; $p(\text{GEEK:GK}) = 0,011$). Różnica istotna statystycznie na korzyść grup eksperymentalnych w stosunku do GK utrzymywała się również po 4 tygodniu leczenia. W tym okresie pole powierzchni odleżyn w grupie, w której zastosowano EWN anodową było mniejsze średnio o 49,34% w stosunku do stanu początkowego; w grupie,

w której aplikowano EWN katodową o 55,40%, a w GK o 25,45% ($p(\text{GEA:GK}) = 0,028$; $p(\text{GEK:GK}) = 0,001$). Podobne efekty obserwowano również w 2 innych badaniach klinicznych,^{206,208} w których oceniono dynamikę zmian pola powierzchni odleżyn II-III stopnia u osób unieruchomionych ze względów ortopedycznych²⁰⁶ oraz u osób w zaawansowanym wieku.²⁰⁸ W pierwszym z tych badań²⁰⁶ badacze przez pierwsze 1-2 tygodnie leczyli odleżyny EWN katodową, a przez kolejne tygodnie stosowali EWN anodową. Przed leczeniem pole powierzchni odleżyn w GE wynosiło 4,54 cm², a w GK 3,97 cm² i różnice pomiędzy grupami nie były istotne statystycznie ($p = 0,600$). Natomiast po 2 tygodniach leczenia pole powierzchni odleżyn w GE zmniejszyło się do 2,11 cm², a w GK uległo zwiększeniu i wynosiło 4,11 cm² ($p(\text{GE:GK}) = 0,008$). Po 6 tygodniach terapii pole powierzchni odleżyn w GE wynosiło 0,79 cm², a w GK 2,67 cm² ($p(\text{GE:GK}) = 0,002$). Z kolei w drugim badaniu²⁰⁸ w GE po pierwszym tygodniu stosowania EWN katodowej pole powierzchni odleżyn było o 35% mniejsze w stosunku do stanu początkowego, natomiast w GK zmniejszyło się średnio o 17,07% ($p(\text{GE:GK}) = 0,032$). Różnica istotna statystycznie pomiędzy grupami na korzyść GE utrzymywała się także po 2, 3 i 5 tygodniu leczenia (odpowiednio $p = 0,018$, $p = 0,013$ i $p = 0,048$). Po zakończeniu leczenia, czyli po 6 tygodniu terapii pole powierzchni odleżyn w GE było mniejsze niż przed leczeniem o 80,31%, a w GK o 54,65%, co dało również różnicę istotną statystycznie na korzyść GE ($p = 0,046$).

Wyniki badania własnego oraz cytowanych randomizowanych badań klinicznych przeprowadzonych przez innych autorów potwierdzają pozytywny wpływ EWN na zmniejszenie pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia u ludzi.

5.2.2. Drugorzędne efekty końcowe badania

Drugorzędnym efektem końcowym badania własnego były ekspresje genów metaloproteinaz (MMP-1, MMP-2, MMP-9) i TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) w odleżynach po 2 i 4 tygodniach stosowania EWN, oraz ich korelacje ze zmianami pola powierzchni odleżyn.

Metaloproteiny

Metaloproteiny macierzy stanowią grupę zależnych od cynku enzymów proteolitycznych, należących do endopeptydaz. Ich podstawową funkcją jest udział w fizjologicznych i patologicznych procesach przebudowy oraz usuwania (degradowania) składników ECM. Metaloproteiny w swoim składzie zawierają atom cynku (Zn^{2+}), który pełni rolę katalityczną i strukturalną w cząsteczce enzymu. Są one syntetyzowane w komórkach w formie pre-proenzymu i uwalniane są do przestrzeni międzykomórkowej w formie

nieaktywnej, jako proenzymy MMP (pro-MMP).^{232,233} Aktywność MMP regulują inhibitory endogenne, w tym α 2-makroglobulina i tkankowe inhibitory metaloproteinaz (ang. tissue inhibitor metaloproteinases, TIMP).²³² W warunkach fizjologicznych MMP uczestniczą w embriogenezie, angiogenezie, agregacji płytek i w gojeniu się ran. Zmiany aktywności MMP obserwuje się w wielu stanach patologicznych, między innymi w procesach zapalnych, chorobach degeneracyjnych i nowotworach.²³²

Pod względem funkcji MMP dzieli się na 3 klasy: kolagenazy, żelatynazy i stromolizyny. Występuje też grupa MMP błonowych (MT-MMP), która w odróżnieniu od trzech poprzednich grup jest zakotwiczona w błonie komórkowej.²³³ Do kolagenaz zalicza się MMP-1, -8, -13 i -18. Żelatynazami są MMP-2 i MMP-9, natomiast MMP-3, -10, i -11 tworzą grupę stromolizyn. Metaloproteinazy typu błonowego to: MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP), MMP-24 (MT5-MMP) i MMP-25 (MT6-MMP).²³⁴

Zadaniem MMP w procesie gojenia się ran jest niszczenie i przebudowa kolagenu, angiogeneza i przebudowa ECM.²³⁵⁻²³⁷ Uczestniczą one w proliferacji, apoptozie i różnicowaniu się komórek.²³⁷ Aktywność MMP jest szczególnie wysoka w ostrej fazie zapalnej i zmniejsza się wraz z ustępowaniem odpowiedzi zapalnej. W ranach przewlekłych występuje podwyższony poziom MMP oraz obniżone stężenie TIMP.²³⁸

Główną kolagenazą u ludzi jest MMP-1. Enzym ten cechuje się unikalną zdolnością do rozszczepiania rodzimych, nienaruszonych cząsteczek kolagenu (typu I, II i III) w jednym miejscu, tj. w regionie helikalnym. Metaloproteinaza-1 rozpoczyna degradację kolagenu i zmieniając stabilność termiczną (temperaturę topnienia) helisy kolagenu, umożliwia żelatynazom (MMP-2, MMP-9), zakończenie procesu degradacji kolagenu.²³⁹ Największy poziom MMP-1 występuje od razu po powstaniu rany, po czym stopniowo zmniejsza się w miarę ustępowania fazy zapalnej. W ranach przewlekłych obserwuje się duże stężenie MMP-1, przy jednoczesnym spadku stężenia jej inhibitora TIMP-1.²⁴⁰ W bliznowcach drastycznie zmniejsza się stężenie TIMP co prowadzi do zwiększonego niszczenia kolagenu wskutek działania MMP, głównie MMP-1. Z kolei zbyt małe stężenie MMP-1 prowadzi do włóknienia rany.²⁴¹

Aktywacja MMP następuje pod wpływem uPA. W ranach przewlekłych obserwuje się dodatnią korelację pomiędzy MMP, a uPA - przy zmniejszonej aktywności uPA zmniejsza się stężenie MMP (w szczególności MMP-9). Oznacza to, że gojenie się ran jest bezpośrednio związane z aktywnością MMP-9 i procesami proteolitycznymi zainicjowanymi przez plazminogen.²³⁸ Stężenia pro-MMP-2, pro-MMP-9 oraz MMP-2 przyjmuje się za markery

określające nasilenie owrzodzeń żylnych.²³⁸ Zwiększone stężenie MMP-1, MMP-2, MMP-8 i MMP-9 przy równoczesnym zmniejszonym stężeniu TIMP-2 wpływa na pogorszenie efektów leczenia owrzodzeń cukrzycowych.²⁴² Podwyższony poziom ekspresji MMP-2 i MMP-9 może prowadzić do zaburzeń angiogenezy.²³⁷ Przy wysokim stężeniu MMP-9 obserwuje się zaburzenia migracji keratynocytów co upośledza odbudowę naskórka.²⁴³

W badaniu własnym po 2 i 4 tygodniach stosowania EWN anodowej i katodowej nie odnotowano zamiennych statystycznie zmian ekspresji genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9. W żadnej z grup nie stwierdzono również istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami MMP-1, MMP-2 i MMP-9 a procentowymi zmianami pola powierzchni odleżyn. Wyników własnych nie można odnieść do badań innych autorów, ponieważ do tej pory w randomizowanych badaniach klinicznych nie oceniano stężeń MMP w odleżynach poddanych działaniu EWN.

TGF- β

Transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β) jest częścią bardzo dużej rodziny białek, które są zaangażowane w rozwój i różnicowanie się komórek.²⁴⁴ Transformujący czynnik wzrostu- β odgrywa dwie bardzo ważne role w stanach zapalnych i naprawczych. Jest on bardzo silnym inhibitorem reaktywności immunologicznej i wpływa na funkcje układu odpornościowego co potwierdziły badania przeprowadzone na myszach.²⁴⁵ W badaniach tych, potomstwo myszy wyhodowanych bez genu TGF- β 1 umierało we wczesnym okresie życia po urodzeniu z powodu masywnej reakcji zapalnej. Drugą ważną rolą TGF- β jest udział w gojeniu się ran, w tym w tworzeniu się ECM. W procesie gojenia się ran TGF- β moduluje funkcje fibroblastów i jest silnym mediatorem, stymulującym produkcję kolagenu typu I i III w fazie proliferacji.⁹⁶ Transformujący czynnik wzrostu- β indukuje również ekspresję wielu innych cząsteczek tkanki łącznej, w tym elastyny, fibronektyny i niektórych proteoglikanów. Równocześnie TGF- β hamuje ekspresję enzymów degradujących tkankę łączną, w tym kolagenaz i innych MMP^{96,246} Transformujący czynnik wzrostu- β w zapoczątkowuje również migrację keratynocytów w obszarze rany.^{236,247}

U ludzi występują trzy formy tego białka, mianowicie – TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3. Stężenia TGF- β 2 oraz TGF- β 3 są wyraźnie wyższe w ciągu 24 godzin po powstaniu rany, ale dużą aktywność TGF- β 2 oraz TGF- β 3 obserwuje się również w ziarninie i w migrującym naskórku.²⁴⁷ Aktywność TGF- β 1 nie jest wysoka w komórkach niezróżnicowanych w początkowej fazie gojenia się ran, ale znacznie wzrasta od 5 dnia powstania rany, wtedy gdy już wszystkie 3 formy TGF- β występują

w komórkach mezynchymalnych oraz blaszce podstawej.²⁴⁷ Dodatkowo po tym czasie TGF- β 2 oraz TGF- β 3 są obecne we wszystkich poziomach warstwy rogowej naskórka, który ulega różnicowaniu.²⁴⁷

Zbyt małe stężenie TGF- β 1 może przedłużać stan zapalny, opóźniać tworzenie się ECM oraz utrudniać naskórkowanie i bliznowacenie ran.^{248,249} Niedobór TGF- β 1 w fazie proliferacji ran koreluje ze zmniejszoną aktywnością TGF- β 2 i TGF- β 3, co spowalnia gojenie się ran.²⁴⁹ Zbyt duże stężenie TGF- β 1 w organizmie również utrudnia gojenie się ran, szczególnie na etapie proliferacji i przebudowy prowadząc do gromadzenia się w ranie tkanki bliznowatej, co skutkuje powstaniem zwłóknień i bliznowców.^{248,250,251}

W badaniu własnym, nie odnotowano istotnego statystycznie wpływu EWN anodowej i katodowej na ekspresję genów TGF- β 1 i TGF- β 2. Nie stwierdzono również istotnego statystycznie wpływu EWN anodowej na ekspresję genów TGF- β 3. Natomiast po 2 i 4 tygodniach stosowania EWN katodowej zaobserwowano zwiększenie ekspresji TGF- β 3 i ekspresja ta po 2 tygodniach elektrostymulacji była znamienne statystycznie większa pod wpływem EWN katodowej w porównaniu do EWN anodowej.

Do tej pory przeprowadzono tylko jedno badanie in vivo, w którym Kim i wsp.²⁰¹ ocenili wpływ EWN katodowej na ekspresję genów TGF- β 1 w ranach eksperymentalnych u zwierząt. Do badania włączono 30 szczurów, w tym 20 szczurów chorych, u których indukowano cukrzycę oraz 10 zdrowych szczurów. U wszystkich zwierząt na grzbiecie wykonano pełnej grubości nacięcie skóry o długości 1,5 cm. Zdrowe szczury stanowiły pierwszą GK (GK1), w której rany nie były poddane leczeniu. Drugą GK stanowiło 10 szczurów z cukrzycą, u których zastosowano symulowaną EWN (GK2). Grupę eksperymentalną (GE) stanowiło pozostałych 10 szczurów z cukrzycą, u których rany leczono przy pomocy EWN. Elektrostymulacja była przeprowadzana przy pomocy elektrod z przewodzącej gumy węglowej (2 cm x 2 cm), które były układane na podkładach z gazy nasączonej solą fizjologiczną (0,9% NaCl). Elektroda lecznicza była umieszczana na powierzchni rany, natomiast elektrodę zamykającą obwód elektryczny umieszczano na zdrowej skórze, kilka centymetrów powyżej elektrody leczniczej. Do EWN wykorzystywano monofazowe, podwójne impulsy szpiczaste, o czasie trwania 140 μ s i częstotliwości 100 Hz. Czas trwania zabiegu EWN wynosił 40 minut. Zabiegi przeprowadzano jeden raz dziennie, przez 7 kolejnych dni. Elektrostymulacja była przeprowadzana pod napięciem 35 – 50 V, prądem, który wywoływał lekko wyczuwalne skurcze mięśniowe. Przez pierwsze 3 dni (faza zapalenia) stosowana była ES katodowa, a przez kolejne 4 dni (faza proliferacji) prowadzono stymulację

anodową. Po 7 dniach interwencji, ekspresja genów TGF- β 1 w ranach u szczurów chorych poddanych EWN (GE) nie różniła się istotnie statystycznie od ekspresji genów TGF- β 1 w ranach u szczurów zdrowych (GK1; $p > 0,05$), ale w obydwu tych grupach było znamienne statystycznie większe ($p < 0,05$) w porównaniu do GK2, w której rany u chorych szczurów poddano symulowanej EWN. Dodatkowo w ranach poddanych EWN w porównaniu do ran, na których wykonywano symulowaną EWN badacze odnotowali także istotnie statystycznie większą ekspresję genów kolagenu typu I ($p = 0,02$) i α -SMA ($p = 0,04$). Gojenie się ran poddanych EWN było znamienne statystycznie szybsze niż ran poddanych symulowanej EWN.

Wyniki opisanego badania in vivo przeprowadzonego przez Kim i wsp.,²⁰¹ jak również wyniki badania własnego wskazują, że EWN katodowa może zwiększać w ranach ekspresję genów izoform TGF- β - odpowiednio TGF- β 1 w badaniu Kim i wsp.²⁰¹ oraz TGF- β 3 w badaniu własnym. Podkreślić należy, że przebiegi prądowe zastosowane w badaniu własnym oraz w badaniu Kim i wsp.²⁰¹ były podobne, mianowicie w obu badaniach EWN przeprowadzano przy pomocy podwójnych impulsów monofazowych o częstotliwości 100 HZ, w badaniu własnym czas trwania impulsu podwójnego wynosił 154 μ s, a w badaniu Kim i wsp.²⁰¹ 140 μ s. W badaniu własnym zabiegi EWN przeprowadzano jeden raz dziennie przez 50 minut, Kim i wsp.²⁰¹ również aplikowali EWN jeden raz dziennie przez 40 minut. W badaniu własnym i w badaniu Kim i wsp.²⁰¹ elektrodą leczniczą była katoda. Wyniki uzyskane w badaniu własnym oraz w badaniu Kim i wsp.²⁰¹ powinny być zachętą do kontynuowania dalszych, wysokiej jakości randomizowanych badań klinicznych celem ostatecznego potwierdzenia wpływu EWN katodowej na ekspresję genów poszczególnych izoform TGF- β w odleżynach i innych ranach przewlekłych u ludzi.

5.3. Zalecenia do stosowania elektrostymulacji wysokonapięciowej w leczeniu odleżyn u ludzi

W badaniu własnym EWN była stosowana zgodnie z metodyką opisywaną w innych randomizowanych badaniach klinicznych, w których leczono odleżyny.^{202,204–206,208,209,227} Warto podkreślić, że badania te zdaniem autorów systematycznych przeglądów badań cechowały się średnią i wysokością jakości dowodu naukowego,^{222,252,253} a ich wyniki były spójne. Mianowicie w badaniach tych (podobnie jak w badaniu własnym) wykazano, że EWN przyczynia się do zmniejszenia pola powierzchni odleżyn oraz przyspiesza ich gojenie się. Biorąc powyższe pod uwagę, badanie własne oraz cytowane badania innych autorów^{202,204–206,208,209,227} wskazują możliwości praktycznego wykorzystania EWN w leczeniu odleżyn u ludzi.

W zabiegach EWN w leczeniu odleżyn stosuje się dwie elektrody, które można układać na podkładach z jałowej gazy nasączonej 0,9% NaCl. Elektrode leczniczą układa się na powierzchni odleżyny, natomiast elektrodę zamykającą obwód elektryczny umieszcza się na zdrowej skórze w odległości przynajmniej 15 cm od elektrody leczniczej. W EWN stosowany jest prąd impulsowy o przebiegu podwójnym szpiczastym. Czas trwania impulsu podwójnego mieści się w zakresie od 50 do 154 μ s, a częstotliwość impulsów wynosi 100 Hz. Natężenie dawkuje się na poziomie, poniżej progu pobudliwości mięśni, a pacjenci z zachowanym czuciem mogą pod elektrodami odczuwać jedynie delikatne wrażenia czuciowe. W badaniach klinicznych dokładnie oblicza się wartość ładunku elektrycznego, który dostarczany jest do tkanek pod elektrodami; ładunek ten mieści się w zakresie od 250 do 500 μ C/s. Zabiegi EWN przeprowadzane są na ogół przez 45 – 60 minut dziennie, od 3 do 7 dni w tygodniu, co daje łącznie od 2,25 do 7 godzin EWN w tygodniu. W badaniach klinicznych leczenie odleżyn przy pomocy EWN prowadzi się na ogół przez 4 do 12 tygodni.^{204–206,208,209,227} Są jednak również badania, w których autorzy stosują EWN aż do zagojenia się ubytku.²⁰²

Wyniki badań przedklinicznych (in vitro oraz in vivo na zwierzętach) wskazują, że katoda i anoda wywierają różny wpływ na procesy leżące u podstaw gojenia się ran. Opierając się na wynikach tych badań stymulację anodową zaleca się głównie w celu pobudzenia stanu zapalnego, zwiększenia aktywności komórek zapalnych i pobudzenia oczyszczania rany. Anodę można również stosować w celu zapoczątkowania angiogenezy.^{174–176} Natomiast katodę można wykorzystywać celem pobudzenia ziarninowania, naskórkowania, bliznowacenia i przebudowy ran.^{176–180,194,195} Wyniki badania własnego oraz innych badań klinicznych^{202,204–206,208,209,227} potwierdzają, że zarówno anoda, jak i katoda przyczyniają się do przyspieszenia gojenia się odleżyn u ludzi i zdaniem autorów systematycznych przeglądów^{222,252,253} badań nie ma potrzeby ustalania ścisłej i jednolitej metodyki aplikacji elektrostymulacji anodowej i katodowej w leczeniu odleżyn. W praktyce klinicznej w leczeniu odleżyn lekarze i fizjoterapeuci mogą samodzielnie podejmować decyzję odnośnie zastosowania anody i katody, biorąc pod uwagę fazę oraz postępy gojenia się ran.

5.4. Moce strony oraz ograniczenia w badaniu własnym

Celem uzyskania jak najwyższej jakości dowodu naukowego w badaniu: oszacowano liczebność w grupach wymaganą do uzyskania istotności statystycznej głównych efektów końcowych badania; zastosowano losowy podział pacjentów do grup; w grupie kontrolnej

aplikowano symulowane zabiegi EWN; wprowadzono zaślepienie, którym objęto pacjentów (ich opiekunów i osoby odwiedzające), personel medyczny (włączając fizjoterapeutów, pielęgniarki, lekarza kwalifikującego chorych do badania, lekarza prowadzącego leczenie chorych oraz chirurga pobierającego skrawki tkanek z odleżyn celem zbadania ekspresji genów MMP i TGF- β), osoby dokonujące oceny klinicznych postępów gojenia się odleżyn (zmian pola powierzchni odleżyn), osoby badające ekspresję genów MMP i TGF- β , oraz osobę przeprowadzającą analizę statystyczną wyników badania. Zaślepieniem nie był objęty główny terapeuta programujący aparat do przeprowadzania EWN aktywnej i symulowanej. Kontakt tego terapeuty z pacjentem był znacznie ograniczony. Jego zadaniem było odpowiednie podłączenie elektrod do aktywnego lub nieaktywnego obwodu elektrycznego, sprawdzenie ułożenia elektrod u pacjenta i włączenie aparatu. W trakcie trwania zabiegu EWN terapeuta nie przebywał przy pacjencie. Wszyscy pacjenci byli hospitalizowani w jednej placówce medycznej, co zapewniło jednolitą opiekę zdrowotną, profilaktykę przeciwoleżynową, wsparcie żywieniowe oraz leczenie odleżyn, leczenie odleżyn były kierowane przez tego samego lekarza, a wszystkie zabiegi EWN były nadzorowane przez tego samego głównego fizjoterapeutę.

W badaniu wystąpiły jednak ograniczenia. Liczebność w grupach mogła być niewystarczająca dla uzyskania istotności statystycznej drugorzędnych wyników końcowych badania. Nie prowadzono leczenia odleżyn aż do ich całkowitego zagojenia się, w związku z czym nie można stwierdzić jak długi czas jest potrzebny aby pod wpływem EWN anodowej i katodowej wyleczyć odleżyny II – IV stopnia. W badaniu nie było możliwości prowadzenia odpowiednio długiej hospitalizacji chorych, pozwalającej na zagojenie się odleżyn ponieważ pacjenci byli ze szpitala wypisywani do domu lub do placówki opiekuńczej po upływie terminu hospitalizacji refundowanego przez system ubezpieczeń społecznych lub wskutek przeniesienia chorego do innego szpitala celem leczenia schorzeń współistniejących.

U wszystkich pacjentów stosowano te same zasady profilaktyki przeciwoleżynowej. Leczenie odleżyn w obu grupach było oparte na tych samych zasadach najlepszych praktyk klinicznych, niemniej jednak z medycznych względów było to leczenie dopasowane do indywidualnych potrzeb pacjenta. A w związku z tym pomimo przyjęcia zawężonych kryteriów włączenia do badania stan poszczególnych odleżyn w trakcie badania różnił się od siebie co wymagało pewnego zróżnicowania środków leczniczych.

W badaniu nie oceniano długoterminowych efektów uzyskanego stopnia wyleczenia odleżyn. W większości przypadków ocena taka byłaby znacznie utrudniona, ponieważ po

zakończeniu hospitalizacji pacjenci wracali do swoich miejsc zamieszkania w różnych miejscach w kraju, często znacznie odległych od szpitala. A ponadto wracając do miejsca zamieszkania byli leczeni według zaleceń miejscowych lekarzy i zespół badawczy nie miał wpływu na przebieg tego leczenia oraz stosowanej u chorych profilaktyki przeciwoleżynowej.

6. WNIOSKI

Wyniki badania pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Anodowa i katodowa elektrostymulacja wysokonapięciowa przeprowadzane przez 4 tygodnie w podobnym stopniu przyczyniają się do zmniejszenia pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego. Istotnie statystycznie zmniejszenie pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia u ludzi występuje już po drugim tygodniu stosowania zarówno anodowej, jak i katodowej EWN efekty te utrzymują się przynajmniej do 4 tygodnia leczenia.
2. Katodowa i anodowa EWN przeprowadzane przez 2 i 4 tygodnie nie wpływają na ekspresję genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w odleżynach II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego.
3. Anodowa EWN przeprowadzana przez 2 i 4 tygodnie nie wpływa na ekspresję genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 w odleżynach II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego. Katodowa EWN przeprowadzana przez 2 i 4 tygodnie również nie wpływa na ekspresję genów TGF- β 1 i TGF- β 2, zwiększa natomiast ekspresję genów TGF- β 3 w odleżynach II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego i ekspresja ta po 2 tygodniach stosowania EWN katodowej jest większa niż pod wpływem EWN anodowej.
4. U pacjentów z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego, poddanych EWN anodowej i katodowej, nie występują silne i istotne statystycznie korelacje pomiędzy ekspresją genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9, a zmianami pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia.
5. U pacjentów z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego, poddanych EWN anodowej i katodowej, nie występują silne i istotne statystycznie korelacje pomiędzy ekspresją genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3, a zmianami pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia.

Wniosek aplikacyjny: W celu zmniejszenia pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami centralnego układu nerwowego oraz celem zwiększenia ekspresji genów TGF- β 3 w obszarze odleżyn można przez 4 tygodnie, przez 5 dni w tygodniu, jeden raz dziennie, przez 50 minut stosować anodową lub katodową EWN, wykorzystując podwójne impulsy szpiczaste, o czasie trwania 154 μ s i częstotliwości 100 Hz. Można wykorzystywać elektrody z przewodzącej gumy węglowej, które należy układać na jałowej gazie nasączonej solą fizjologiczną. Elektrode leczniczą należy układać na powierzchni odleżyny, natomiast elektrodę zamykającą obwód elektryczny należy umieszczać na zdrowej skórze, w odległości przynajmniej 15 cm od elektrody

lecniczej. Rekomendacja ta wynika z badania własnego oraz z wyników randomizowanych badań klinicznych prowadzonych przez innych autorów.^{202,204–206,208,209,227}

7. Piśmiennictwo

1. Dunn SL. The wound healing process. In: McCulloch JM, Kloth LC, eds. *Wound Healing. Evidence-Based Management*. 4th Editio. Philadelphia: Davis Company; 2010:9-34.
2. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601.
doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
3. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83:835-870.
4. Ruggeri ZM. Platelets in artherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8:1227-1234.
5. Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods Jr VL, Marguerie GA, Ginsberg MH. Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood*. 1985;66(3):724-727.
6. Bauer E., Cooper TW, Huang JS, Altman J, Deuel TF. Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(12):4132-4136.
7. Brissett AE, Hom DB. The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;11(4):245-250.
8. Weisel JW, Francis CW, Nagaswami C, Marder VJ. Determination of the topology of factor XIIIa-induced fibrin gamma-chain cross-links by electron microscopy of ligated fragments. *J Biol Chem*. 1993;268(35):26618-26624.
9. Bennett JS. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:340-354.
10. Ugarova TP, Yakubenko VP. Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:368-385.
11. Yakovlev S, Zhang L, Ugarova TP, Medved L. Interaction of fibrin(ogen) with leukocyte receptor alpha M beta 2 (Mac-1): further characterization and identification of a novel binding region within the central domain of the fibrinogen gamma-module. *Biochemistry*. 2005;44(2):617-626.

12. Rybarczyk BJ, Lawrence SO, Simpson-Haidaris PJ. Matrix-fibrinogen enhances wound closure by increasing both cell proliferation and migration. *Blood*. 2003;102(12):4035-4043.
13. Sahni A, Francis CW. Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires $\alpha v \beta 3$. *Blood*. 2004;104(12):3635-3641.
14. Suehiro K, Gailit J, Plow EF. Fibrinogen is a ligand for integrin $\alpha 5 \beta 1$ on endothelial cells. *J Biol Chem*. 1997;272(8):5360-5366.
15. Farrell D., Al-Mondhiry H. Human fibroblast adhesion to fibrinogen. *Biochemistry*. 1997;36(5):1123-1128.
16. Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood*. 2003;101(5):1810-1817.
17. Marx G. Immunological monitoring of Fenton fragmentation of fibrinogen. *Free Radic Res Commun*. 1991;12-13:517-520.
18. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9:653-660.
19. Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 2003;3(7):643-651.
20. Becker JC, Domschke W, Pohle T. Biological in vitro effects of fibrin glue: fibroblast proliferation, expression and binding of growth factors. *Scand J Gastroenterol*. 2004;39(10):927-932.
21. Kilarski WW, Jura N, Gerwins P. An ex vivo model for functional studies of myofibroblasts. *Lab Investig a J Tech Methods Pathol*. 2005;85(5):643-654.
22. Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2005;77(4):487-495.
23. Vestweber D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev*. 2007;218:178-196.
24. Rose DM, Alon R, Ginsberg MH. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion

- and migration. *Immunol Rev.* 2007;218:126-134.
25. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 2007;21(2):99-111.
 26. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Bröcker EB, Gillitzer R. Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10, and mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol.* 1998;153(6):1849-1860. doi:10.1016/S0002-9440(10)65699-4
 27. Clark RAF. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair.* New York: Plenum Press; 1996.
 28. Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: immunological aspects. *Injury.* 2006;37:5-12.
 29. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New Engl J od Med.* 1989;320(6):365-376.
 30. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):514-525. doi:10.1038/sj.jid.5700701
 31. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:173-182.
 32. Burkitt H, Young B, Heath J. Blood. In: *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas.* Hong Kong: Churchill Livingstone; 1993:42-60.
 33. Crowther M, Brown N, Bishop E, Lewis C. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol.* 2001;70(4):478-490.
 34. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004;187(5A):11-16.
 35. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003;73(2):209-212.
 36. Wells CA, Ravasi T, Faulkner GJ, et al. Genetic control of the innate immune response.

- BMC Immunol.* 2003;4:5-23.
37. Williams L, Jarai G, Smith A, Finan P. IL-10 expression profiling in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2002;72(4):800-809.
 38. Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol.* 2002;169(5):2253-2263.
 39. Stout RD, Suttles J. T cell signaling of macrophage function in inflammatory disease. *Front Biosci.* 1997;2:197-206.
 40. Stout RD, Suttles J. T-cell signaling of macrophage activation. In: Landes RG, ed. *Cell Contact-Dependent and Cytokine Signals*. Austin, TX: Springer-Verlag; 1995.
 41. Jaffe EA, Ruggiero JT, Falcone DJ. Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood.* 1985;65(1):79-84.
 42. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2000;68:1-8.
 43. Fivenson DP, Faria DT, Nickoloff BJ, et al. Chemokine and inflammatory cytokine changes during chronic wound healing. *Wound Repair Regen.* 1997;5(4):310-322.
 44. Barbul A. Immune aspects of wound repair. *Clin Plast Surg.* 1990;17(3):433-442.
 45. Kovacs EJ, DiPietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994;8(11):854-861.
 46. Gu Q, Wang D, Gai Y, et al. Expression of MMP1 in surgical and radiation-impaired wound healing and its effects on the healing process. *J Environmental Pathol Toxicol Oncol.* 2002;21(1):71-78.
 47. Schaffer MR, Tantry U, van Wesep RA, Barbul A. Nitric oxide metabolism in wounds. *J Surg Res.* 1997;71(1):25-31.
 48. Reicher JS, Meszaros AJ, Louis CA, et al. Molecular and Metabolic Evidence for the Restricted Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Healing Wounds. *Am J Pathol.* 1999;154(4):1097-1104.

49. Lee RH, Efron D, Tantry U, Barbul A. Nitric oxide in the healing wound: a time-course study. *J Surg Res*. 2001;101(1):104-108.
50. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(10):787-799.
51. Davidson S, Gilead L, Amira M, Ginsburg H, Razin E. Synthesis of chondroitin sulfate D and heparin proteoglycans in murine lymph node-derived mast cells. The dependence on fibroblasts. *J Biol Chem*. 1990;265(21):12324-12330.
52. Gilead L, Livni N, Eliakim R, et al. Human gastric mucosal mast cells are chondroitin sulphate E-containing mast cells. *Immunology*. 1987;62(1):23-28.
53. Weller CL, Collington SJ, Brown JK, et al. Leukotriene B₄, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. *J Exp Med*. 2005;201(12):1961-1971.
54. Bauer SM, Bauer RJ, C VO. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovascular Surg*. 2005;39(4):293-306.
55. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005;105(3):1068-1077.
56. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5(4):434-438.
57. Bauer SM, Goldstein LJ, Bauer RJ, Chen H, Putt M, Velazquez OC. The bone marrow-derived endothelial progenitor cell response is impaired in delayed wound healing from ischemia. *J Vasc Surg*. 2006;43(1):134-141.
58. Albina JE, Henry WL, Mastrofrancesco B, Martin BA, Reicher JS. Macrophage activation by culture in an anoxic environment. *J Immunol*. 1995;155(9):4391-4396.
59. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*. 2004;10(8):858-864.
60. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide

- synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003;9(11):1370-1376.
61. Lu J, Zhang Y, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Research Tech*. 2003;60(1):107-114.
 62. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science (80-)*. 1989;246(4935):1309-1312.
 63. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science (80-)*. 1987;235(4787):442-447.
 64. Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol*. 1990;111(2):731-741.
 65. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*. 1992;3(2):211-220.
 66. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol*. 1996;149(1):293-305.
 67. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):13612-13617.
 68. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273(21):13313-13316.
 69. Peters KG, Werner S, Chen G, Williams LT. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development*. 1992;114(1):233-243.
 70. Kanda S, Landgren E, Ljungstrom M, Claesson-Welch L. Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T

- transgenic mice. *Cell Growth Differ.* 1996;7(3):383-395.
71. Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature.* 1987;325(6101):257-259.
 72. Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1990;142(1):117-128.
 73. Enestein J, Waleh NS, Kramer RH. Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1992;203(2):499-503.
 74. Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA. Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest.* 1996;97(6):1436-1446.
 75. Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, Garcia M. Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol.* 1993;155(3):595-605.
 76. Kim KY, Jeong SY, Won J, Ryu PD, Nam MJ. Induction of angiogenesis by expression of soluble type II transforming growth factor-beta receptor in mouse hepatoma. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38781-38786.
 77. Trompezinski S, Perner I, Mayoux C, Schmitt D, Viac J. Transforming growth factor-beta1 and ultraviolet A1 radiation increase production of vascular endothelial growth factor but not endothelin-1 in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2000;143(3):539-545.
 78. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbi A, Attisano L, Bernabeu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem.* 2000;276(42):38527-38535.
 79. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes:

- differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*. 2001;166(12):7556-7562.
80. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994;1(1):71-81.
 81. Metz CN. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(7):1342-1350.
 82. Deuel TF. Growth factors, wound healing, and neoplasia platelet-derived growth factor as a model cytokine. *Int J Cell Cloning*. 1991;9(1):60-71.
 83. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1283-1316.
 84. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(2):197-250.
 85. Schafer BM, Maier K, Eickhoff U, Todd RF, Kramer MD. Plasminogen activation in healing human wounds. *Am J Pathol*. 1994;144(6):1269-1280.
 86. Steffensen B, Hakkinen L, Larjava H. Proteolytic events of wound healing: coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(5):373-398.
 87. Schneider IC, Haugh JM. Quantitative elucidation of a distinct spatial gradient-sensing mechanism in fibroblasts. *J Cell Biol*. 2005;171(5):883-892.
 88. Pierce GF, Mustoe TA, Altrrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem*. 1991;45(4):319-326.
 89. Woodley DT, O'Keefe EJ, Prunieras M. Cutaneous wound healing: a model for cell-matrix interactions. *J Am Acad Dermatology*. 1985;12:420-433.
 90. Grotendorst GR. Alteration of the chemotactic response of NIH/3T3 cells to PDGF by growth factors, transformation, and tumor promoters. *Cell*. 1984;36(2):279-285.
 91. Ross R, Bowen-Pope DF, Raines EW. Platelet-derived growth factor: its potential roles in

- wound healing, atherosclerosis, neoplasia, and growth and development. *Ciba Found Symp.* 1985;116:98-112.
92. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Woodward SC. Epidermal growth factor increases granulation tissue formation dose dependently. *J Surg Res.* 1987;43(4):322-328.
 93. Franklin TJ, Gregory H, Morris WP. Acceleration of wound healing by recombinant human urogastrone (epidermal growth factor). *J Lab Clinial Med.* 1986;108(2):103-108.
 94. Kanzler MH, Gorsulowsky DC, Swanson NA. Basic mechanisms in the healing cutaneous wound. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986;12(11):1156-1164.
 95. McGrath MH, Hundahl SA. The spatial and temporal quantification of myofibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 1982;69(6):975-985.
 96. Varga J, Jimenez SA. Stimulation of normal human fibroblast collagen production and processing by transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;138(2):974-980.
 97. Burgeson RE. The collagens of skin. *Curr Probl Dermatol.* 1987;17:61-75.
 98. Fleischmajer R. Collagen fibrillogenesis: a mechanism of structural biology. *J Invest Dermatol.* 1986;87(5):553-554.
 99. Braverman IM, Fonferko E. Studies in cutaneous aging: I. The elastic fiber network. *J Invest Dermatol.* 1982;78(5):434-443.
 100. Anseth A. Glycosaminoglycans in corneal regeneration. *Exp Eye Res.* 1961;1:122-127.
 101. Price RD, Myers S, Leigh IM, Navsaria HA. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *Am J Clin Dermatol.* 2005;6(6):393-402.
 102. Heldin P, Laurent TC, Heldin CH. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J.* 1989;258(3):919-922.
 103. Wood GC. The formation of fibrils from collagen solutions. 3. Effect of chondroitin sulphate and some other naturally occurring polyanions on the rate of formation. *Biochem J.* 1960;75(3):605-612.

104. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Integrating cells into tissues. In: *Molecular Cell Biology*. New York: WH Freeman; 1999:968-1002.
105. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):526-537.
106. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(5):349-363.
107. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971;27(5):549-550.
108. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol*. 2001;159(3):1009-1020.
109. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):998-1008.
110. Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming Growth Factor- β 1 Promotes the Morphological and Functional Differentiation of the Myofibroblast. *Exp Cell Res*. 2000;257(1):180-189.
111. L R-J, Petersen OW. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Investig a J Tech Methods Pathol*. 1993;68(6):696-707.
112. O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(1):63-78.
113. Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641.
114. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*. 1994;331(19):1286-1292.

115. Schmid P, Itin P, Cherry G, Bi C, Cox DA. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol.* 1998;152(2):485-493.
116. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, et al. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol.* 1990;10(4):1492-1497.
117. Jimenez PA, Rampy MA. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J Surg Res.* 1999;81(2):238-242.
118. Garlick JA, Taichman LB. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Investig a J Tech Methods Pathol.* 1994;70(6):916-924.
119. Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):6896-6900.
120. Iwamoto R, Mekada E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cykonine Growth Factor Rev.* 2000;11(4):335-344.
121. Stracke ML, Kohn EC, Aznavoorian SA, et al. Insulin-like growth factors stimulate chemotaxis in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153(3):1076-1083.
122. Yue J, Mulder KM. Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther.* 2001;91(1):1-34.
123. Hoffman J, Twisselmann C, Kummer MP, Romagnoli P, Herzog V. A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation. *Eur J Cell Biol.* 2000;79(12):905-914.
124. Kirfel G, Borm B, Rigort A, Herzog V. The secretory beta-amyloid precursor protein is a motogen for human epidermal keratinocytes. *Eur J Cell Biol.* 2002;81(12):664-676.
125. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(5):613-620.

126. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(5):534-540.
127. Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):624-632.
128. Grondahl-Hansen J, Lund LR, Ralfkiaer E, Ottenvanger V, Dano K. Urokinase- and tissue-type plasminogen activators in keratinocytes during wound reepithelialization in vivo. *J Invest Dermatol.* 1988;90(6):790-795.
129. Kirfel G, Herzog V. Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance. *Protoplasma.* 2004;223(2-4):67-78.
130. Juliano R. Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 1996;18(11):911-917.
131. Shyy JY, Chein S. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(5):707-713.
132. Rosenfeldt H, Lee DJ, Grinnell F. Increased c-fos mRNA Expression By Human Fibroblasts Contracting Stressed Collagen Matrices. *Mol Cell Biol.* 1998;18(5):2659-2667.
133. Sabiston D. *Textbook of Surgery: The Biologic Basis of Modern Surgical Practice.* 15th ed. St. Louis; 1997.
134. Ehrlich HP, Krummel TM. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair Regen.* 1996;4(2):203-210.
135. Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW, Ting K. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(2):638-647.
136. Werb Z, Tremble P, Damsky CH. Regulation of extracellular matrix degradation by cell—extracellular matrix interactions. *Cell Differ Dev.* 1990;32(3):299-306.
137. Circolo A, Welgus HG, Pierce GF, Kramer J, Strunk RC. Differential regulation of the

- expression of proteinases/antiproteinases in fibroblasts. Effects of interleukin-1 and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 1991;266(19):12283-12288.
138. Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing an overview. *Clin Plast Surg*. 2003;30(1):1-12.
 139. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*. 1998;25(3):321-340.
 140. DiPietro LA, Nissen NN, Gamelli RL, Koch AE, Pyle JM, Polverini PJ. Thrombospondin 1 synthesis and function in wound repair. *Am J Pathol*. 1996;148(6):1851-1860.
 141. Raugi GJ, Olerud JE, Gown AM. Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol*. 1987;89(6):551-554.
 142. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol*. 1998;140(4):947-959.
 143. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science (80-)*. 2000;287(5457):1427-1430.
 144. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414(6859):98-104.
 145. Mirza RE, Koh TJ. Contributions of cell subsets to cytokine production during normal and impaired wound healing. *Cytokine*. 2015;71(2):409-412.
 146. Goldberg MT, Han Y-P, Yan C, Shawn MC, Garner WL. TNF α suppresses α -smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127(11):2645-2655.
 147. Kurose T, Hashimoto M, Ozawa J, Kawamata S. Analysis of gene expression in experimental pressure ulcers in the rat with special reference to inflammatory cytokines. *PLoS One*. 2015;10(7):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0132622
 148. Jiang L, Dai Y, Cui F, et al. Expression of cytokines, growth factors and apoptosis-related signal molecules in chronic pressure ulcer wounds healing. *Spinal Cord*. 2014;52(2):145-151. doi:10.1038/sc.2013.132

149. Sato Y, Ohshima T, Kondo T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265(1):194-199. doi:10.1006/bbrc.1999.1455
150. Dommisch H, Winter J, Götz W, et al. Effect of growth factors on antimicrobial peptides and pro-inflammatory mediators during wound healing. *Clin Oral Investig.* 2015;19(2):209-220. doi:10.1007/s00784-014-1239-9
151. Pierre EJ, Perez-Polo JR, Mitchell AT, Matin S, Foyt HL, Herndon DN. Insulin-like growth factor-I liposomal gene transfer and systemic growth hormone stimulate wound healing. *J Burn Care Rehabil.* 1997;18(4):287-291. doi:10.1097/00004630-199707000-00002
152. Steenfos HH. Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1994;28(2):95-105. doi:10.3109/02844319409071186
153. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200(4):500-503. doi:10.1002/path.1427
154. Roberts A, Russo A, Felici A, Flanders K. Smad3: A key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF- β . *Ann N Y Acad Sci.* 2003;995:1-10.
155. Andersen JL, Ledet T, Ehlers N. Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. *Curr Eye Res.* 1997;16(6):605-613.
156. Roy SG, Nozaki Y, Phan SH. Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(7):723-734.
157. Vogel LC, Krajci KA, Anderson CJ. Adults with pediatric-onset spinal cord injury, part I: prevalence of medical complications. *J Spinal Cord Med.* 2002;25(2):106-116.
158. Krause JS, Broderic L. Patterns of recurrent pressure ulcers after spinal cord injury: identification of risk protective factors 5 or more years after onset. *Arch Phys Med Rehabil.* 2004;85(8):1257-1264.
159. Wilborn D, Grittner U, Dassen T, Kottner J. The National Expert Standard Pressure Ulcer

- Prevention in Nursing and pressure ulcer prevalence in German health care facilities: a multilevel analysis. *J Clin Nurs*. 2010;19(23-24):3364-3371.
160. Abel RL, Warren K, Bean G, et al. Quality improvement in nursing homes in Texas: results from a pressure ulcer prevention project. *J Am Med Dir Assoc*. 2005;6(3):181-188.
161. Igarashi A, Yamamoto-Mitani N, Gushiken Y, Takai Y, Tanaka M, Okamoto Y. Prevalence and incidence of pressure ulcers in Japanese long-term-care hospitals. *Arch Gerontol Geriatr*. 2013;56(1):220-226.
162. Langemo DK, Anderson J, Volden C. Uncovering pressure ulcer incidence. *Nurs Manage*. 2003;34(10):54-57.
163. Cuddigan J. Critical Care. In: Pieper B, ed. *National Pressure Ulcer Advisory Panel*. Washington, DC: NPUAP; 2012.
164. Conner T, Sledge JA, Bryant-Wiersema L, Stamm L, Potter P. Identification of pre-operative and intra-operative variables predictive of pressure ulcer development in patients undergoing urologic surgical procedures. *Urol Nurs*. 2010;30(5):289-295, 305.
165. Schuurman JP, Schoonhoven L, Keller BPJ, Van Ramshorst B. Do pressure ulcers influence length of hospital stay in surgical cardiothoracic patients? A prospective evaluation. *J Clin Nurs*. 2009;18(17):2456-2463. doi:10.1111/j.1365-2702.2008.02711.x
166. Rice I, Peters J, Rice L, Jan Y-K. Influence of wheelchair user interface and personal characteristics on static and dynamic pretibial skin pressures in elite wheelchair racers, a pilot study. *J Spinal Cord Med*. 2019;42(5):613-621.
167. Derman W, Schwellnus M, Jordaan E, Blauwet CA, Emery C. Illness and injury in athletes during the competition period at the London 2012 Paralympic Games: development and implementation of a web-based surveillance system (WEB-IISS) for team medical staff. *Br J Sports Med*. 2013;47(7):420-425.
168. Theisen D. Cardiovascular determinants of exercise capacity in the Paralympic athlete with spinal cord injury. *Exp Physiol*. 2012;97(3):319-324.
169. Fagher K, Baumgart J, Solli G, Holmberg H, Lexell J, Sandbakk O. Preparing for snow-sport

- events at the Paralympic Games in Beijing in 2022: recommendations and remaining questions. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2022;8(1):1294.
170. Haesler E, ed. *European Pressure Ulcer Advisory Panel, National Pressure Injury Advisory Panel and Pan Pacific Pressure Injury Alliance. Prevention and Treatment of Pressure Ulcers/Injuries: Clinical Practice Guideline. The International Guideline.* EPUAP/NPUAP/PPPIA; 2019.
 171. Foulds I, Barker A. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. *Br J Dermatol.* 1983;109:515-522.
 172. Reid B, Zhao M. The Electrical Response to Injury: Molecular Mechanisms and Wound Healing. *Adv Ski Wound Care.* 2014;3:184-201.
 173. Kloth LC, Zhao M. Endogenous and exogenous electrical fields for wound healing. In: McCulloch J, Kloth L, eds. *Wound Healing. Evidence-Based Management.* 4th editio. Philadelphia: FA Davis Company; 2010:450-513.
 174. Orida N, Feldman J. Directional protrusive pseudopodial activity and motility in macrophages induced by extracellular electric fields. *J Muscle Res Cell Motil.* 1982;2(3):243-255.
 175. Fukushima K. Studies of galvanotaxis of leukocytes. *Med J Osaka Univ.* 1953;4:195-208.
 176. Bai H, McCaig CD, Forrester J V., Zhao M. DC Electric Fields Induce Distinct Preangiogenic Responses in Microvascular and Macrovascular Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1234-1239.
 177. Bourguignon GJ, Jy W, Bourguignon LYW. Electric stimulation of human fibroblasts causes an increase in Ca²⁺ influx and the exposure of additional insulin receptors. *J Cell Physiol.* 1989;140(2):379-385. doi:10.1002/jcp.1041400224
 178. Erickson CA, Nuccitelli R. Embryonic Fibroblast Motility and Orientation Can Be Influenced by Physiological Electric Fields. *J Cell Biol.* 1984;98:296-307.
 179. Nishimura KY, Isseroff RR, Nuccitelli R. Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds. *J*

- od Cell Sci.* 1996;109:199-207.
180. Bourguignon GJ, Bourguignon LYW. Electric stimulation of protein and DNA synthesis in human fibroblasts. *FASEB J.* 1987;1(5):398-402.
 181. Hampton S, King L. Healing an intractable wound using bio-electrical stimulation therapy. *Br J Nurs.* 2005;14:30-32.
 182. Petrofsky J, Hinds CM, Batt J, Prowse M, Suh HJ. The interrelationships between electrical stimulation, the environment surrounding the vascular endothelial cells of the skin, and the role of nitric oxide in mediating the blood flow response to electrical stimulation. *Med Sci Monit.* 2007;13(9):391-397.
 183. Ma S-X, Mayer E, Lee P, Li X, Gao EZ. Transcutaneous Electrical Stimulation Increased Nitric Oxide-Cyclic GMP Release Biocaptured Over Skin Surface of Pericardium Meridian and Acupuncture Points in Humans. *Acupunct Electrother Res.* 2015;40(2):73-86.
 184. Mohajeri-Tehrani MR, Nasiripoor F, Torkaman G, Hedayati M, Annabestani Z, Asadi MR. Effect of low-intensity direct current on expression of vascular endothelial growth factor and nitric oxide in diabetic foot ulcers. *J Rehabil Res Dev.* 2014;51(5):815-824.
doi:10.1682/JRRD.2013.08.0174
 185. Hampton S, Collis F. Treating a pressure ulcer with bio-electric stimulation therapy. *Br J Nurs.* 2006;15:14-18.
 186. Polak A, Kucio C, Kloth LC, et al. A Randomized, Controlled Clinical Study to Assess the Effect of Anodal and Cathodal Electrical Stimulation on Periwound Skin Blood Flow and Pressure Ulcer Size Reduction in Persons with Neurological Injuries. *Ostomy Wound Manag.* 2018;64(2):10-29. doi:10.25270/owm.2018.2.1029
 187. Wu L, Gao X, Brown RC, Heller S, O'Neil RG. Dual role of the TRPV4 channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(5):1699-1713.
 188. Maloney-Hinds C, Petrofsky JS, Zimmerman G, Hessinger DA. The role of nitric oxide in skin blood flow increases due to vibration in healthy adults and adults with type 2

- diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2009;11(1):39-43.
189. Gürgen SG, Sayın O, Çetin F, Tuç Yücel A. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) accelerates cutaneous wound healing and inhibits pro-inflammatory cytokines. *Inflammation.* 2014;37(3):775-784. doi:10.1007/s10753-013-9796-7
 190. Karavidas AI, Raisakis KG, Parissis JT, et al. Functional electrical stimulation improves endothelial function and reduces peripheral immune responses in patients with chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2006;13(4):592-597.
 191. Kanno S, Oda N, Abe M, et al. Establishment of a simple and practical procedure applicable to therapeutic angiogenesis. *Circulation.* 1999;99(20):2682-2687.
 192. Patterson C, Runge MS. Therapeutic angiogenesis: the new electrophysiology? *Circulation.* 1999;99(20):2614-2616.
 193. Asadi MR, Torkaman G, Hedayati M. Effect of sensory and motor electrical stimulation in vascular endothelial growth factor expression of muscle and skin in full-thickness wound. *J Rehabil Res Dev.* 2011;48(3):195-202.
 194. Asadi MR, Torkaman G, Hedayati M, Mohajeri-Tehrani MR, Ahmadi M, Gohardani RF. Angiogenic effects of low-intensity cathodal direct current on ischemic diabetic foot ulcersA randomized controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;127:147-155. doi:10.1016/j.diabres.2017.03.012
 195. Asadi MR, Torkaman G, Hedayati M, Mofid M. Role of sensory and motor intensity of electrical stimulation on fibroblastic growth factor-2 expression, inflammation, vascularization, and mechanical strength of full-thickness wounds. *J Rehabil Res Dev.* 2013;50(4):489-498.
 196. Zhao M, Bai H, Wang E, Forrester J V., McCaig CD. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *J Cell Sci.* 2004;117(3):397-405. doi:10.1242/jcs.00868
 197. Bai H, Forrester J V., Zhao M. DC electric stimulation upregulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors. *Cytokine.* 2011;55(1):110-115.

198. Ud-Din S, Sebastian A, Giddings P, et al. Angiogenesis Is Induced and Wound Size Is Reduced by Electrical Stimulation in an Acute Wound Healing Model in Human Skin. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124502.
199. Sebastian A, Syed F, Perry D, et al. Acceleration of cutaneous healing by electrical stimulation: degenerate electrical waveform down-regulates inflammation, up-regulates angiogenesis and advances remodeling in temporal punch biopsies in a human volunteer study. *Wound Repair Regen*. 2011;19(6):693-708.
200. Rouabhia M, Park H, Meng S, Derbali H, Zhang Z. Electrical Stimulation Promotes Wound Healing by Enhancing Dermal Fibroblast Activity and Promoting Myofibroblast Transdifferentiation. *PLoS One*. 2013;8(8):e71660.
201. Kim TH, Cho H, Lee SM. High-Voltage Pulsed Current Stimulation Enhances Wound Healing in Diabetic Rats by Restoring the Expression of Collagen, α -Smooth Muscle Actin, and TGF- β 1. *Tohoku J Exp Med*. 2014;234(1):1-6.
202. Kloth LC, Feedar JA. Acceleration of wound healing with high voltage, monophasic, pulsed current. *Phys Ther*. 1988;68(4):503-508. doi:10.1093/ptj/68.4.503
203. Gentzkow G, Alon G, Taler G. Healing of refractory stage III and IV pressure ulcers by a new electrical stimulation device. *Wounds*. 1993;5:160-172.
204. Griffin JW, Tooms RE, Mendius RA, Clifft JW, Vander Zwaag R, El-Zeky F. Efficacy of High Voltage Pulsed Current for Healing of Pressure Ulcers in Patients with Spinal Cord Injury. *Phys Ther*. 1991;71(6):433-442.
205. Houghton PE, Campbell KE, Fraser CH, et al. Electrical Stimulation Therapy Increases Rate of Healing of Pressure Ulcers in Community-Dwelling People With Spinal Cord Injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2010;91(5):669-678. doi:10.1016/j.apmr.2009.12.026
206. Franek A, Kostur R, Polak A, et al. Using High-Voltage Electrical Stimulation in the Treatment of Recalcitrant Pressure Ulcers: Results of a Randomized, Controlled Clinical Study. *OSTOMY WOUND Manag*. 2012;58(3):30-44.
207. Polak A, Taradaj J, Nawrat-Szoltysik A, et al. Reduction of pressure ulcer size with high-

- voltage pulsed current and high-frequency ultrasound: A randomised trial. *J Wound Care*. 2016;25(12):742-754. doi:10.12968/jowc.2016.25.12.742
208. Polak A, Kloth LC, Blaszcak E, et al. Evaluation of the Healing Progress of Pressure Ulcers Treated with Cathodal High-Voltage Monophasic Pulsed Current: Results of a Prospective, Double-blind, Randomized Clinical Trial. *Adv Ski Wound Care*. 2016;29(10):447-459. doi:10.1097/01.ASW.0000493164.75337.de
209. Polak A, Kloth LC, Blaszcak E, et al. The Efficacy of Pressure Ulcer Treatment With Cathodal and Cathodal-Anodal High-Voltage Monophasic Pulsed Current: A Prospective, Randomized, Controlled Clinical Trial. *Phys Ther*. 2017;97(8):777-789.
210. Karsli PB, Gurcay E, Karaahmet OZ, Cakci A. High-Voltage Electrical Stimulation Versus Ultrasound in the Treatment of Pressure Ulcers. *Adv Ski Wound Care*. 2017;30(12):565-570. doi:10.1097/01.ASW.0000526606.72489.99
211. Gentzkow G, Pollack S, Kloth L, Stubbs H. Improved Healing of Pressure Ulcers Using Dermapulse, A New Electrical Stimulation Device. *Wounds*. 1991.
212. Karba R, Vodovnik L, Presern-Strukeij M, Klesnik M. Promoted healing of chronic wounds due to electrical stimulation. *Wounds*. 1991;3:16-23.
213. Jerčinović A, Karba R, Vodovnik L, et al. Low Frequency Pulsed Current and Pressure Ulcer Healing. *IEEE Trans Rehabil Eng*. 1994;2(4):225-233. doi:10.1109/86.340876
214. Karba R, Benko H, Savrin R, Vodovnik L. Combination of occlusive dressings and electrical stimulation in pressure ulcer treatment. *Med Sci Res*. 1995;23(10):671-673.
215. Baker LL, Rubayi S, Villar F, Demuth SK. Effect of electrical stimulation waveform on healing of ulcers in human beings with spinal cord injury. *Wound Repair Regen*. 1996;4(1):21-28. doi:10.1046/j.1524-475X.1996.40106.x
216. Lawson D, Petrofsky JS. A randomized control study on the effect of biphasic electrical stimulation in a warm room on skin blood flow and healing rates in chronic wounds of patients with and without diabetes. *Med Sci Monit*. 2007;13(6):258-263.
217. Adunsky A, Ohry A. Decubitus direct current treatment (DDCT) of pressure ulcers: Results

- of a randomized double-blinded placebo controlled study. *Arch Gerontol Geriatr.* 2005;41(3):261-269. doi:10.1016/j.archger.2005.04.004
218. Karba R, Semrov D, Vodovnik L, Benko H, Savrin R. DC electrical stimulation for chronic wound healing enhancement Part 1. Clinical study and determination of electrical field distribution in the numerical wound model. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1997;43(2):265-270.
219. Franek A, Polak A, Kucharzewski M. Modern application of high voltage stimulation for enhanced healing of venous crural ulceration. *Med Eng Phys.* 2000;22(9):647-655. doi:10.1016/S1350-4533(00)00077-1
220. Houghton PE, Kincaid CB, Lovell M, et al. Effect of electrical stimulation on chronic leg ulcer size and appearance. *Phys Ther.* 2003;83(1):17-28.
221. Peters E, Lavery L, Armstrong D, Fleischli J. Electric stimulation as an adjunct to heal diabetic foot ulcers: A randomized clinical trial. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001;82(6):721-725.
222. Polak A, Franek A, Blaszcak E, et al. A prospective, randomized, controlled, clinical study to evaluate the efficacy of high-frequency ultrasound in the treatment of Stage II and Stage III pressure ulcers in geriatric patients. *Ostomy Wound Manag.* 2014;60(8):16-28.
223. Mittmann N, Chan BC, Craven BC, Isogai PK, Houghton P. Evaluation of the cost-effectiveness of electrical stimulation therapy for pressure ulcers in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2011;92(6):866-872. doi:10.1016/j.apmr.2010.12.038
224. Polak A, Kloth LC, Paczula M, et al. Pressure Injuries Treated with Anodal and Cathodal High-voltage Electrical Stimulation: The effect on blood serum concentration of cytokines and growth factors in patients with neurological injuries. A randomized clinical study. *Wound Manag Prev.* 2019;65(11):19-32. doi:10.25270/wmp.2019.11.1932
225. Moher D, Hopewell S, Schulz KF, et al. CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *J Clin Epidemiol.* 2010;63(8):1-37.

226. European Pressure Ulcer Advisory Panel, Panel NPUA, Alliance PPPI. *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers/Injuries: Clinical Practice Guideline. European Pressure Ulcer Advisory Panel, Panel NPUA, Alliance PPPI. Prevention and Treatment of Pressure Ulcers/Injuries: Clinical Practice Guideline., 2019.* Tment of Pressur.; 2019.
227. Polak A, Kucio C, Kloth LC, et al. A Randomized, Controlled Clinical Study to Assess the Effect of Anodal and Cathodal Electrical Stimulation on Periwound Skin Blood Flow and Pressure Ulcer Size Reduction in Persons with Neurological Injuries. *OSTOMY WOUND Manag.* 2018;64(2):10-29.
228. National Pressure Ulcer Advisory Panel European Pressure Advisory Panel and Pacific Pressure Injury Alliance. *Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Clinical Practice Guideline.* (Haesler E, ed.). Osborne Park, Western, Australia: Cambridge Media; 2014.
229. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):45.
230. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(9):36.
231. Szewczyk M, Sopata M, Jawien A. Zalecenia profilaktyki i leczenia odleżyn. *Leczenie ran.* 2010;7(3-4):79-106.
232. Śliwowska I, Kopczyński Z. Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi. *Współczesna Onkol.* 2005;9(8):327-335.
233. Starska K, Stasikowska O, Lukomski M, Lewy-Trenda I. Korelacja ekspresji metaloproteiny błonowej macierzy zewnątrzkomórkowej typu I (MT1-MMP) we froncie nacieku nowotworowego z cechami kliniczno-morfologicznymi w raku płaskonabłonkowym krtani. *Pol Merkur Lek.* 2007;135(23):188-191.
234. Zhang H, Adwanikar H, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: Evolving roles in injury and reparative processes. *Neuroscientist.* 2010;16(2):156-170. doi:10.1177/1073858409355830

235. Beare AHM, O’Kane S, Krane SM, Ferguson MWJ. Severely impaired wound healing in the collagenase-resistant mouse. *J Invest Dermatol*. 2003;120(1):153-163.
doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12019.x
236. Joo CK, Seomun Y. Matrix metalloproteinase (MMP) and TGF beta 1-stimulated cell migration in skin and cornea wound healing. *Cell Adh Migr*. 2008;2(4):252-253.
doi:10.4161/cam.2.4.6772
237. Naduk-Kik J, Hrabec E. Udział metaloproteinaz macierzy w patogenezie cukrzycy i rozwoju retinopatii cukrzycowej. *Postepy Hig Med Dosw*. 2008;62:442-450.
238. Moore K, Huddleston E, Stacey MC, Harding KG. Venous leg ulcers - The search for a prognostic indicator. *Int Wound J*. 2007;4(2):163-172. doi:10.1111/j.1742-481X.2007.00335.x
239. Parks WC. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen*. 1999;7:423-432.
240. Krishnaswamy VR, Mintz D, Sagi I. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2017;1864(11):2220-2227.
doi:10.1016/j.bbamcr.2017.08.003
241. Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol*. 2015;44-46:113-121. doi:10.1016/j.matbio.2015.03.002
242. Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*. 2002;45(7):1011-1016. doi:10.1007/s00125-002-0868-8
243. Reiss M, Han Y, Garcia E, Goldberg M, Hong Y, Garner W. Matrix Metalloproteinase-9 Delays Wound Healing in a Murine Wound Model. *Surgery*. 2010;147(2):295-302.
doi:10.1016/j.surg.2009.10.016.Matrix
244. Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, Sidawy AN. Transforming Growth Factor- β and Wound Healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*. 2006;18(1):55-62.
doi:10.1177/153100350601800123
245. Schmidt-Weber C, Blaser K. Regulation and role of transforming growth factor –beta in

- immune tolerance induction and inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(6):709-716.
246. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2007;13(22):3056-3062.
247. Levine JH, Moses HL, Gold LI, Nanney LB. Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor β 1, β 2, and β 3 during excisional wound repair. *Am J Pathol*. 1993;143(2):368-380.
248. Shah M, Revis D, Herrick S, et al. Role of elevated plasma transforming growth factor- β 1 levels in wound healing. *Am J Pathol*. 1999;154(4):1115-1124. doi:10.1016/S0002-9440(10)65364-3
249. Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG. Delayed wound healing in immunodeficient TGF- β 1 knockout mice. *J Invest Dermatol*. 2000;115(1):3-11. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00010.x
250. Flanders KC, Burmester JK. Medical applications of transforming growth factor-beta. *Clin Med Res*. 2003;1(1):13-20. doi:10.3121/cmr.1.1.13
251. Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG. Role of TGF β -mediated inflammation in cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2006;11(1):112-117. doi:10.1038/sj.jidsymp.5650004
252. Houghton PE. Clinical trials involving biphasic pulsed current, microcurrent, and/or low-intensity direct current. *Adv Wound Care*. 2014;3(2):166-183.
253. Houghton PE. Electrical stimulation therapy to promote healing of chronic wounds: a review of reviews. *Chronic Wound Care Manag Res*. 2017;4:25-44.

8. Wykaz tabel

Tabela 1. Kolejność nukleotydów w starterach.....	32
Tabela 2. Wskaźniki wykorzystane do oceny zmiany pola powierzchni odleżyn.....	38
Tabela 3. Wyniki oceny jednorodności grup przed leczeniem (liczba pacjentów = 60).....	43
Tabela 4. Wyniki oceny jednorodności grup przed leczeniem (liczba pacjentów = 60), c.d.	44
Tabela 5. Zmiany pola powierzchni odleżyn w poszczególnych tygodniach terapii w obrębie grup (n = 60).....	46
Tabela 6. Porównanie zmian pola powierzchni odleżyn pomiędzy grupami (n = 60).....	49
Tabela 7. Porównanie relatywnej ekspresji mRNA metaloproteinaz przed terapią oraz po 2 i 4 tygodniach terapii w obrębie grup i pomiędzy grupami (n = 41).....	53
Tabela 8. Porównanie relatywnej ekspresji mRNA izoform TGF- β przed terapią oraz po 2 i 4 tygodniach terapii w obrębie grup i pomiędzy grupami (n = 40).....	57
Tabela 9. Wyniki badania korelacji pomiędzy RE mRNA MMP-1,2,9 przed interwencją oraz po 2 i 4 tygodniach interwencji, a procentową zmianą pola powierzchni odleżyn (Liczba pacjentów = 41).....	58
Tabela 10. Wyniki badania korelacji pomiędzy RE mRNA TGF- β 1,2,3 przed interwencją oraz po 2 i 4 tygodniach interwencji, a procentową zmianą pola powierzchni odleżyn (Liczba pacjentów = 40).....	59

9. Wykaz rycin

Rycina 1. Aparat do elektrostymulacji wraz z kompletem elektrod wykonanych z przewodzącej gumy węglowej (fotografia własna).....	34
Rycina 2. Przebieg prądu elektrycznego wykorzystywanego w elektrostymulacji (publikacja fotografii za zgodą autorki, Anny Polak).....	35
Rycina 3. a) Układanie elektrody leczniczej na powierzchni odleżyny; b) Mocowanie elektrody leczniczej na powierzchni odleżyny (fotografie własne).....	35
Rycina 4. a) Umieszczenie elektrod w czasie elektrostymulacji odleżyny w okolicy krętarza większego kości udowej; b) Umieszczenie elektrod w czasie elektrostymulacji odleżyny w okolicy kości krzyżowej. W obydwu przypadkach elektrodą leczniczą jest katoda, która jest ułożona na odleżynie. Elektroda zamykająca obwód elektryczny jest ułożona na udzie, poniżej elektrody leczniczej (fotografie własne).....	36
Rycina 5. Przebieg badania (zgodnie z wytycznymi CONSORT). GEA – grupa eksperymentalna, w której stosowano elektrostymulację anodową; GEK – grupa eksperymentalna, w której stosowano elektrostymulację katodową; GK – grupa kontrolna; MMP – metaloproteinaza; TGF- β – transformujący czynnik wzrostu; n – liczba.....	41
Rycina 6. Zmiany pola powierzchni [cm ²] odleżyn w poszczególnych grupach (GEA – grupa, w której stosowano elektrostymulację anodową, GEK - grupa, w której stosowano elektrostymulację katodową, GK - grupa kontrolna; *różnica istotna statystycznie w stosunku do stanu początkowego (p = 0,01; test ANOVA Friedmana).....	47
Rycina 7. Procentowa zmiana pola powierzchni odleżyn w stosunku do stanu przed leczeniem w grupach GEA, GEK i grupie kontrolnej [%]; *różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (p < 0,05; test post-hoc Kruskala Wallisa); **różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej (p < 0,01; test post-hoc Kruskala Wallisa).....	50

10. Streszczenie w j. polskim

Wstęp: Gojenie się ran jest złożonym procesem, którego celem jest naprawa tkanek oraz przywrócenie funkcji skóry. W czasie gojenia się ran pracę komórek w nim uczestniczącym regulują mediatory procesu gojenia się ran - chemokiny, cytokiny, enzymy, hormony i czynniki wzrostu.

Rany przewlekłe które nie goją się prawidłowo to poważny problem zdrowotny, który dotyczy wiele milionów osób na świecie. Występuje wtedy zbyt duża aktywność cytokin prozapalnych i proteaz, przy równoczesnym zmniejszonym działaniu cytokin przeciwzapalnych i inhibitorów proteaz. Dodatkowo można zaobserwować zmniejszoną aktywność czynników wzrostowych i ich receptorów w błonach komórek uczestniczących w gojeniu się ran.

Jedną z najczęściej występujących ran przewlekłych są odleżyny, na które cierpią osoby po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego, osoby przebywające w placówkach opieki długoterminowej oraz pacjenci na oddziałach intensywnej terapii.

Leczenie odleżyn jest procesem długotrwałym i kosztowym, dlatego poszukiwane są metody, które mogą ograniczyć koszty i mogą być stosowane w warunkach domowych. W tym celu coraz częściej wykorzystuje się elektrostymulację i bada się jej możliwości w leczeniu ran przewlekłych.

Cel: Głównym celem badania było uzyskanie wiedzy na temat oddziaływania EWN na proces gojenia się odleżyn II-IV stopnia u osób po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego. Celami szczegółowymi były odpowiedzi na pytania czy EWN anodowa i katodowa przyczyni się do zmniejszenia pola powierzchni odleżyn po 1, 2, 3 i 4 tygodniu leczenia oraz czy EWN anodowa i katodowa spowoduje zmiany ekspresji genów wybranych metaloproteinaz (MMP-1, MMP-2 i MMP-9) i poszczególnych izoform transformującego czynnika wzrostu- β (TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3). Szukano również odpowiedzi na pytanie czy wystąpią silne i istotne statystycznie korelacje między zmianami pola powierzchni odleżyn a ekspresją genów mRNA MMP-1, MMP-2, MMP-9, TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 u osób z odleżynami II-IV stopnia. Aplikacyjnym celem badania było wskazanie możliwości wykorzystania anodowej i katodowej EWN w leczeniu odleżyn II-IV stopnia u osób po uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego.

Materiał i metody: W badaniu uczestniczyło 60 osób z odleżynami II-IV stopnia w wieku 22 – 78 lat. Uczestników podzielono losowo na 3 grupy, po 20 osób – grupa poddana EWN anodowej (GEA), grupa poddana EWN katodowej (GEK) i grupa kontrolna (GK). Wszystkie osoby leczono

zgodnie z rekomendacjami klinicznymi. Elektrostymulację wysokonapięciową wykonywano przy pomocy impulsów elektrycznych podwójnych, szpiczastych, których łączny czas trwania wynosił 154 μ s, a częstotliwość 100 Hz. Wartość szczytowa prądu wynosiła 0,36 A. Natężenie dawkowano poniżej progu pobudliwości mięśni szkieletowych. Do tkanek dostarczano ładunek elektryczny wynoszący 360 μ C/s. W grupie GEA elektrodą leczniczą była anoda, w GEK – katoda, a w grupie kontrolnej była EWN symulowana. Wśród tych 60 osób włączonych do badania, 41 osób (14 osób w GEA, 12 w GEK i 15 w GK) wyraziło zgodę na pobieranie skrawków tkanek z odleżyn celem oznaczenia ekspresji genów MMP i TGF- β .

Wyniki: Zarówno w GEA, jak i GEK pole powierzchni zmniejszyło się istotnie statystycznie w 2,3 i 4 tygodniu terapii ($p = 0,01$). W GK pole powierzchni również uległo zmniejszeniu, jednak nie było to istotne statystycznie ($p > 0,05$). Zmiany relatywnej ekspresji mRNA MMP-1, MMP-2 i MMP-9 we wszystkich grupach nie wykazały różnic istotnych statystycznie w poszczególnych punktach czasowych (test ANOVA Friedmana dla MMP-1: GEA: $p = 0,6065$; GEK: $p = 0,6675$; GK: $p = 0,0780$; test ANOVA Friedmana dla MMP-2: GEA: $p = 0,8071$; GEK: $p = 0,8616$; GK: $p = 0,6918$; test ANOVA Friedmana dla MMP-9: GEA: $p = 0,5258$; GEK: $p = 0,2974$; GK: $p = 0,4703$). Zmiany RE mRNA TGF- β 1 we wszystkich grupach nie zmieniły się istotnie statystycznie w poszczególnych punktach czasowych (GEA: $p = 0,2574$, GEK: $p = 0,8257$, GK: $p = 0,5165$). Nieistotne statystycznie okazały się również zmiany relatywnej ekspresji mRNA TGF- β 2 we wszystkich grupach, zbadanych za pomocą testu ANOVA Friedmana (GEA: $p = 0,8071$, GEK: $p = 0,8257$, GK: $p = 0,3365$). W GEA, GEK i GK nie wykazano istotnych zmian w RE mRNA TGF- β 3 w wyniku terapii (test ANOVA Friedmana odpowiednio: $p = 0,1537$, $p = 0,6675$, $p = 0,7928$). Przed interwencją wykryto różnicę istotną statystycznie pomiędzy grupami w odniesieniu do RE mRNA TGF- β 3 (test ANOVA Kruskala Wallisa: $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0,0020$). Analiza post hoc Kruskala Wallisa wykazała, że przed interwencją RE mRNA TGF- β 3 w GEA oraz w GEK była znamienne statystycznie mniejsza niż w GK ($p(\text{GEA:GK}) = 0,0013$; $p(\text{GEK:GK}) = 0,0397$). Pomiedzy grupami eksperymentalnymi przed interwencją RE mRNA TGF- β 3 nie różniła się istotnie statystycznie ($p(\text{GEA:GEK}) = 0,1940$). Po 2 tygodniach interwencji RE mRNA TGF- β 3 zwiększyła się w GEK istotnie statystycznie w porównaniu do GEA (test post-hoc: $p(\text{GEA;GEK}) = 0,0453$), równocześnie zmiana nie różniła się istotnie statystycznie w porównaniu do GK (test post-hoc: $p(\text{GEK:GK}) = 0,9130$). W GEA RE mRNA TGF- β 3 po 2 tygodniach interwencji nadal była na poziomie istotnie statystycznie niższym niż w GK (test post-hoc: $p(\text{GEA:GK}) = 0,0008$). Po 4 tygodniach RE mRNA TGF- β 3 w GEA nadal utrzymywała się na poziomie znamienne statystycznie niższym niż w GK (test post-hoc: $p(\text{GEA:GK}) = 0,0165$). W

GEK RE mRNA TGF- β 3 uległa nieistotnemu statystycznie zmniejszeniu w stosunku do stanu po 2 tygodniach interwencji i nie był już znamienne statystycznie wyższa niż w GEA (test post-hoc: $p(\text{GEA:GEK}) = 0,1190$), nadal utrzymywał się na poziomie porównywalnym do GK (test post-hoc: $p(\text{GEK:GK}) = 0,9990$).

Wnioski:

Anodowa i katodowa elektrostymulacja wysokonapięciowa przeprowadzane przez 4 tygodnie w podobnym stopniu przyczyniają się do zmniejszenia pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego. Istotne statystycznie zmniejszenie pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia u ludzi występuje już po drugim tygodniu stosowania zarówno anodowej, jak i katodowej EWN efekty te utrzymują się przynajmniej do 4 tygodnia leczenia.

Katodowa i anodowa EWN przeprowadzane przez 2 i 4 tygodnie nie wpływają na ekspresję genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9 w odleżynach II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego.

Anodowa EWN przeprowadzana przez 2 i 4 tygodnie nie wpływa na ekspresję genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3 w odleżynach II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego. Katodowa EWN przeprowadzana przez 2 i 4 tygodnie również nie wpływa na ekspresję genów TGF- β 1 i TGF- β 2, zwiększa natomiast ekspresję genów TGF- β 3 w odleżynach II-IV stopnia u osób z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego i ekspresja ta po 2 tygodniach stosowania EWN katodowej jest większa niż pod wpływem EWN anodowej.

U pacjentów z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego, poddanych EWN anodowej i katodowej, nie wystąpią silne i istotne statystycznie korelacje pomiędzy ekspresją genów MMP-1, MMP-2 i MMP-9 a zmianami pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia.

U pacjentów z uszkodzeniami ośrodkowego układu nerwowego, poddanych EWN anodowej i katodowej, nie wystąpią silne i istotne statystycznie korelacje pomiędzy ekspresją genów TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3, a zmianami pola powierzchni odleżyn II-IV stopnia.

Słowa kluczowe: odleżyny, elektrostymulacja, elektrostymulacja wysokonapięciowa, ekspresja genów, metaloproteiny, MMP-1, MMP-2, MMP-9, transformujący czynnik wzrostu- β , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3.

11. Streszczenie w j. angielskim

Introduction: Wound healing is a complex process aimed at repairing tissues and restoring skin functions. During wound healing, the functioning of the cells involved is regulated by mediators of the wound healing process - chemokines, cytokines, enzymes, hormones and growth factors.

Chronic wounds that do not heal properly are a serious health problem that affects many millions of people around the world. There is then too much activity of pro-inflammatory cytokines and proteases, with a simultaneous reduced effect of anti-inflammatory cytokines and protease inhibitors. Additionally, reduced activity of growth factors and their receptors can be observed in the membranes of cells involved in wound healing.

One of the most common chronic wounds are bedsores, which affect people who have suffered damage to the central nervous system, people staying in long-term care facilities and patients in intensive care units.

Treatment of pressure ulcers is a long-term and expensive process, so methods are being sought that can reduce costs and can be used at home. For this purpose, electrostimulation is increasingly used and its possibilities in the treatment of chronic wounds are being investigated.

The aim: The main aim of the study was to obtain knowledge about the impact of EWN on the healing process of stage II-IV pressure ulcers in people after damage to the central nervous system. The specific objectives were to answer the questions whether anodal and cathodic EWN would contribute to reducing the area of pressure sores after the 1st, 2nd, 3rd and 4th week of treatment and whether anodal EWN and cathodic will cause changes in the gene expression of selected metalloproteinases (MMP-1, MMP-2 and MMP-9) and individual isoforms of transforming growth factor- β (TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3). We also sought answers to the question whether there would be strong and statistically significant correlations between changes in the surface area of pressure ulcers and the expression of MMP-1, MMP-2, MMP-9, TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 mRNA genes in people with pressure ulcers II- IV degree. The application goal of the study was to indicate the possibility of using anodal and cathodic EWN in the treatment of stage II-IV pressure ulcers in people with injuries to the central nervous system.

Material and methods: The user included 60 people with stage II-IV pressure ulcers, aged 22-78. The participants were randomly divided into 3 groups, 20 people each - a group subjected to

anodal ECT (GEA), a group subjected to cathodal ECT (GEK) and a control group (GK). All people were treated in accordance with clinical recommendations. High-voltage electrostimulation performed using double, pointed electrical impulses, the total duration of which is 154 μ s and occurs at 100 Hz. The peak value of the current source was 0.36 A. The power intensity was below the excitability threshold of skeletal muscles. To deliver a supplied electric current of 360 μ C/s. In the GEA group, the treatment electrode was the anode, in the GEK - the cathode, and in the control group - simulated EWN. Of these 60 people undergoing the study, 41 people (14 people in GEA, 12 in GEK and 15 in GK) agreed to take sections from pressure ulcers and determine the expression of MMP and TGF- β genes.

Results: Both in GEA and GEK the surface area decreased statistically significantly in weeks 2, 3 and 4 of therapy ($p = 0.01$). In the CG, the surface area also decreased, but it was not statistically significant ($p > 0.05$). Changes in the relative expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 mRNA in all groups did not show statistically significant differences at individual time points (Friedman's ANOVA test for MMP-1: GEA: $p = 0.6065$; GEK: $p = 0, 6675$; GK: $p = 0.0780$; Friedman's ANOVA test for MMP-2: GEA: $p = 0.8071$; GEK: $p = 0.8616$; GK: $p = 0.6918$; Friedman's ANOVA test for MMP-9: GEA: $p = 0.5258$; GEK: $p = 0.2974$; GK: $p = 0.4703$). RE changes of TGF- β 1 mRNA in all groups did not change statistically significantly at individual time points (GEA: $p = 0.2574$, GEK: $p = 0.8257$, GK: $p = 0.5165$). Changes in the relative expression of TGF- β 2 mRNA in all groups, tested using the Friedman ANOVA test, also turned out to be statistically insignificant (GEA: $p = 0.8071$, GEK: $p = 0.8257$, GK: $p = 0.3365$). GEA, GEK and GK showed no significant changes in the RE of TGF- β 3 mRNA as a result of therapy (Friedman's ANOVA test, respectively: $p = 0.1537$, $p = 0.6675$, $p = 0.7928$). Before the intervention, a statistically significant difference was detected between groups in terms of RE TGF- β 3 mRNA (Kruskal Wallis ANOVA test: $p(\text{GEA:GEK:GK}) = 0.0020$). Kruskal Wallis post hoc analysis showed that before the RE intervention, TGF- β 3 mRNA in GEA and GEK was statistically significantly lower than in GK ($p(\text{GEA:GK}) = 0.0013$; $p(\text{GEK:GK}) = 0.0397$). Between the experimental groups before the RE intervention, TGF- β 3 mRNA did not differ statistically significantly ($p(\text{GEA:GEK}) = 0.1940$). After 2 weeks of RE intervention, TGF- β 3 mRNA increased statistically significantly in GEK compared to GEA (post-hoc test: $p(\text{GEA;GEK}) = 0.0453$), at the same time the change did not differ statistically significantly compared to GK (test post-hoc: $p(\text{GEK:GK}) = 0.9130$). In GEA RE, TGF- β 3 mRNA after 2 weeks of intervention was still at a statistically significantly lower level than in CG (post-hoc test: $p(\text{GEA:GK}) = 0.0008$). After 4 weeks, the RE of TGF- β 3 mRNA in GEA was still statistically significantly lower than in GK (post-hoc test:

$p(\text{GEA:GK}) = 0.0165$). In GEK RE, TGF- β 3 mRNA was statistically insignificantly decreased compared to the state after 2 weeks of intervention and was no longer statistically significantly higher than in GEA (post-hoc test: $p(\text{GEA:GEK}) = 0.1190$), it was still maintained at a level comparable to GK (post-hoc test: $p(\text{GEK:GK}) = 0.9990$).

Conclusions:

Anodal and cathodic high-voltage electrical stimulation performed for 4 weeks contribute to a similar extent to reducing the area of II-IV degree pressure ulcers in people with damage to the central nervous system. A statistically significant reduction in the area of stage II-IV pressure ulcers in humans occurs already after the second week of use of both anodic and cathodic EWN, and these effects persist at least until the 4th week of treatment.

Cathodic and anodal EWN performed for 2 and 4 weeks do not affect the expression of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 genes in stage II-IV pressure ulcers in people with damage to the central nervous system.

Anodal EWN performed for 2 and 4 weeks does not affect the expression of TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 genes in stage II-IV pressure ulcers in people with damage to the central nervous system. Cathodic EWN performed for 2 and 4 weeks also does not affect the expression of TGF- β 1 and TGF- β 2 genes, but increases the expression of TGF- β 3 genes in stage II-IV pressure ulcers in people with damage to the central nervous system, and this expression after 2 weeks of EWN cathodic is greater than under the influence of anodic EWN.

In patients with central nervous system damage who underwent anodal and cathodal ECT, there will be no strong and statistically significant correlations between the expression of the MMP-1, MMP-2 and MMP-9 genes and changes in the area of grade II-IV pressure ulcers.

In patients with central nervous system damage who underwent anodal and cathodal ECT, there will be no strong and statistically significant correlations between the expression of TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 genes and changes in the area of grade II-IV pressure ulcers.

Keywords: pressure ulcers, electrostimulation, high-voltage pulsed current, surface area, gene expression, MMP, TGF- β